

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT
DE METHODES PHYSICO-CHIMIQUES
POUR LA SEPARATION, L'IDENTIFICATION
ET LA DETERMINATION QUANTITATIVE
DE SUBSTANCES ORGANIQUES**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

GUSTAV SZEKELY

Ingenieur chimiste diplômé

de l'école polytechnique de Bucarest

pour l'obtention du grade de

Docteur ès Sciences

Institut de Chimie
de l'Université
de Neuchâtel

Février 1973

Université de Neuchâtel
Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT
DE METHODES PHYSICO-CHIMIQUES
POUR LA SEPARATION, L'IDENTIFICATION
ET LA DETERMINATION QUANTITATIVE
DE SUBSTANCES ORGANIQUES**

Thèse présentée à la Faculté des Sciences par

GUSTAV SZEKELY

Ingenieur chimiste diplômé

de l'école polytechnique de Bucarest

pour l'obtention du grade de

Docteur ès Sciences

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Contribution au développement de méthodes physico-chimiques pour la séparation, l'identification et la détermination quantitative de substances organiques
de M. Gustave Szekely

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport de Messieurs les professeurs

A. Jacot-Guillarmod, R. Tabacchi et

R. Zbinden (Bâle)

autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 12 septembre 1973

Le doyen :

A. Jacot-Guillarmod

A. Jacot-Guillarmod

TABLE DES MATIERES

	Page
1. INTRODUCTION	1
1.1. Préface	1
1.2. Revue historique	2
1.3. Objet de notre investigation	3
1.4. Bibliographie chap. 1	4
2. QUELQUES PROBLEMES GENERAUX DE CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE	5
2.1. Comparaison de différentes couches	5
2.2. Standardisation des solvants	13
2.3. Diagnostie des artefacts	16
2.4. Corrélation des spots	22
2.5. Bibliographie chap. 2	24
3. IDENTIFICATION DES COMPOSES SEPARES PAR LA CHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE OU MICROPREPARATIVE	25
3.1. Identification par réactions colorées et vitesse de migration	25
3.2. Identification par spectroscopie IR, MS, RMN, microanalyse élémentaire après séparation sur couches épaisses	27
3.3. Identification par microtransfer CCM-IR	45
3.4. Identification par microtransfer CCM-MS	56
3.5. Bibliographie chap. 3	66
4. CHROMATOGRAPHIE QUANTITATIVE SUR COUCHE MINCE	68
4.1. La méthode visuelle	68
4.2. La détermination par la spectroscopie UV et VIS après l'extraction	74
4.3. La méthode "in situ" par spectroscopie de rémission UV et VIS	78
4.4. La méthode "in situ" par spectroscopie de fluorescence	102
4.5. Bibliographie chap. 4	123



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555006_0054

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. Vorwort	1
1.2. Geschichtliche Entwicklung	2
1.3. Zielsetzungen	3
1.4. Literatur zu Kapitel 1	4
2. ALLGEMEINE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE PROBLEME	5
2.1. Vergleich von selbsthergestellten mit käuflichen DC-Schichten	5
2.2. Fließmittel Normierung	13
2.3. Erkennung von chromatographischen Artefakten	16
2.4. Zuordnung von chromatographischen Zonen	22
2.5. Literatur zu Kapitel 2	24
3. IDENTIFIZIERUNG DER CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN KOMPONENTEN	25
3.1. Identifizierung durch Farbreaktionen und R _f -Werte	25
3.2. Identifizierung durch IR, MS, NMR und Mikroanalyse, nach der präparativen DC-Trennung	27
3.3. Identifizierung durch Mikrotransfer DC-IR	45
3.4. Identifizierung durch Mikrotransfer DC-MS	56
3.5. Literatur zu Kapitel 3	66
4. QUANTITATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE	68
4.1. Die visuelle Auswertung	68
4.2. Die spektrophotometrische Auswertung nach Extraktion aus der Sorptionsschicht	74
4.3. Die direkte "in situ" Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen durch Remissionsspektrophotometrie im UV-VIS Bereich	78
4.4. Die direkte "in situ" Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen mittels Fluoreszenzmessungen	102
4.5. Literatur zu Kapitel 4	123

Le présent travail a été effectué de Janvier 1968 à Juillet 1972 dans les Laboratoires de Chimie Analytique de la Société CIBA-GEIGY SA à Bâle.

La rédaction a été entreprise avec la collaboration de Monsieur le Professeur A. Jacot-Guillarmod, directeur de l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel, à qui j'exprime ma profonde et respectueuse gratitude pour l'intérêt qu'il n'a cessé de me témoigner et pour les précieux conseils dont il m'a gratifié au cours de ce travail.

A la Société CIBA-GEIGY SA à Bâle, j'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir grandement aidé dans l'accomplissement de ce travail.

1. EINLEITUNG

1.1 Vorwort

Die synthetischen und die natürlichen organischen Stoffe sind in der Regel Gemische und es ist die Aufgabe der Analytik, die einzelnen Komponenten qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Sofern eine selektive Analysenmethode zur Verfügung steht, ist es möglich, eine beliebige Komponente direkt in einem Gemisch zu bestimmen. Ist dies nicht der Fall, so kann man versuchen, die zu bestimmende Komponente zuerst zu trennen und die Bestimmung erst anschliessend auszuführen. Nebst den altbekannten Trennverfahren wie Destillation, Kristallisation und Extraktion haben sich in den letzten Jahrzehnten die chromatographischen Trennmethoden eine wichtige Stellung in der Analytik erobert. Die eine dieser Methoden, die Dünnschichtchromatographie, verblüfft durch ihre Einfachheit und Wirksamkeit. Sie hat in den letzten 10-15 Jahren den Zugang zu fast allen chemischen Laboratorien gefunden. In dieser Arbeit spielt die Dünnschichtchromatographie eine zentrale Rolle. Wir versuchten, die Methode besser zu beherrschen, neue Techniken einzuführen und damit die Anwendungsmöglichkeiten zu erweitern. Das Gewicht liegt auf der methodologischen Seite; die wichtigsten Kapitel sind mit konkreten Anwendungsbeispielen ergänzt.

.2 Geschichtliche Entwicklung

Das Grundprinzip der Dünnschichtchromatographie wurde bereits 1938 von IZMAILOV und SCHRAIBER [1] beschrieben. Sie trennten pharmazeutische Tinkturen auf losen Kieselgel- und Aluminiumoxyd-Schichten, doch fand die Arbeit keine Beachtung. Erst viele Jahre später haben mehrere Autoren auf die Arbeit von IZMAILOV und SCHRAIBER zurückgegriffen, wie z.B. MEINHARD und HALL [2], MILLER und KIRCHNER [3], KIRCHNER, MILLER und KELLER [4], KIRCHNER und RICE [5]. Sie trennten hauptsächlich fettlösliche Verbindungen, doch auch diese Arbeiten blieben wenig beachtet. Erst nach den grundlegenden Arbeiten von STAHL [6-12] in den Jahren 1956-61 wurde diese Trennmethode zum Allgemeingut. Er hat nämlich geeignete Geräte konstruiert, die Methode standardisiert und, was noch wichtiger ist, deren universelle Verwendbarkeit erkannt. 1962 erschienen die ersten Monographien [13, 14], welche hauptsächlich den praktisch orientierten Chemiker ansprechen. Die Entwicklung ist auch während der letzten 10 Jahre nicht stehen geblieben. Die Apparaturen wurden verbessert, neue Sorptionsmittel entwickelt, Gradient-Schichten eingeführt, fabrikmäßig hergestellte Platten und Folien in den Handel gebracht. Die anfänglich nur für qualitative Zwecke eingeführte Methode wurde vermehrt auch für quantitative Bestimmungen verwendet. Es wurden neuartige Geräte konstruiert, welche die "in situ"-Bestimmung der Komponenten auf der Schicht erlauben. Eine gute Zusammenfassung der letzten Fortschritte gaben DE ZEEUW und BOLLIGER [15].

1.3 Zielsetzungen

Mit unserer Arbeit verfolgten wir folgende Ziele:

- a) Ausarbeitung von Prüfmethoden zur besseren Kenntnis der angebotenen Schichtmaterialien und der fabrikmässig hergestellten Fertigplatten
- b) Einführung von Standard-Fließmitteln zwecks Rationalisierung bei der Optimierung von Trennbedingungen
- c) Einfache und rasche Erkennung von chromatographischen Artefakten
- d) Prüfung der bestehenden DC-IR und DC-MS Mikrotransfer Techniken.
Entwicklung von neuen Mikrotransfer Techniken
- e) Verbesserungen bei der präparativen Schichtchromatographie
(Lokalisierung mit Leitsubstanzen, Reinigung der isolierten Komponenten)
- f) Verbesserungen bei der quantitativen Dünnschichtchromatographie
(Erhöhung der Genauigkeit, Reduzierung des Zeitaufwandes).

1.4 Literatur

- /1/ N.A. IZMAILOV, M.S. SCHRAIBER, Farmatzija, Moskau, 3.1 (1938)
- /2/ J.E. MEINHARD, N.F. HALL, Anal. Chem., 21.185 (1949)
- /3/ J.M. MILLER, J.G. KIRCHNER, Anal. Chem., 23.428 (1951), 24.1480 (1952), 25.1107 (1953), 26.2002 (1954)
- /4/ J.G. KIRCHNER, J.M. MILLER und G.J. KELLER, Anal. Chem., 23.420 (1951)
- /5/ J.G. KIRCHNER, R.G. RICE, J. Agr. Food Chem., 2.1031 (1954)
- /6/ E. STAHL, Pharmazie, 11.633 (1956)
- /7/ E. STAHL, Chemiker Ztg., 82.323 (1958)
- /8/ E. STAHL, Parfümerie u. Kosmetik, 9.564 (1958)
- /9/ E. STAHL, Arch. Pharm., 64.411 (1959)
- /10/ E. STAHL, Z. Analyt. Chem., 181.303 (1961)
- /11/ E. STAHL, Angew. Chem., 73.646 (1961)
- /12/ E. STAHL, Z. Physiolog. Chem., 323.182 (1961)
- /13/ E. STAHL, Dünnschicht-Chromatographie, Springer Verlag, 1962
- /14/ K. RANDEPATH, Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie, 1962
- /15/ R.A. DE ZEEUW, H.R. BOLLIGER, Critical Reviews in Analytical Chemistry, Vol. 1 März (1970).

2. ALLGEMEINE DUENNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE PROBLEME

2.1 Vergleich von selbsthergestellten mit käuflichen DC-Schichten

2.1.1 Problemstellung

Wir haben bereits im Jahre 1969 die damals erhältlichen Fertigplatten und Folien mit unseren selbsthergestellten DC-Schichten verglichen. In den letzten Jahren steigerte sich das Sortiment der käuflichen Schichten, so dass wir 1972 die Testversuche wiederholen mussten. Wir stellten uns dabei die Frage, inwieweit die selbsthergestellten Schichten mit käuflichen ersetzt werden können.

2.1.2 Bezeichnung der untersuchten Schichten

Die Untersuchung beschränkte sich auf 19 verschiedene Kieselgelschichten von 20 x 20 cm Standardformat. Drei davon wurden von uns selber hergestellt und 16 sind käufliche Platten bzw. Folien. Die Tabelle 1 enthält Angaben über die selbsthergestellten Schichten, während in Tabelle 2 die genaue Bezeichnung, Herstellerfirma, Schichtdicke und Trägermaterial der käuflichen Schichten aufgeführt sind.

Tab. 1

Selbsthergestellte Schichten

Nr.	Bezeichnung	Sorptionsmittel Hersteller
1	Kieselgel GHR/UV ₂₅₄	Macherey, Nagel & Co.
2	Kieselgel GF ₂₅₄	Merck
3	Kieselgel GF	Woelm

Tab. 2

Käufliche Schichten

Nr.	Bezeichnung	Hersteller-Firma	Schichtdicke in μ (werkangabe)	Träger- material
4	Fertigplatte K'gel DF-B	Camag	250	Glas
5	Fertigplatte SIL-G-25/UV ₂₅₄	Macherey, Nagel & Co.	250	"
6	Folie Polygram SIL-G/UV ₂₅₄	"	250	Polyester
7	Folie Polygram SIL-N-HR/UV ₂₅₄	"	200	"
8	Fertigplatte K'gel 60 F ₂₅₄	Merck	250	Glas
9	Fertigplatte K'gel schnellaufend F ₂₅₄	"	250	"
10	Folie K'gel F ₂₅₄	"	250	Polyester
11	Alufolie K'gel 60 F ₂₅₄	"	250	Aluminium
12	Fertigplatte K'gel F ₂₅₄	Woelm	250	Glas
13	Fertigplatte Rapid K'gel F ₂₅₄	"	250	"
14	Fertigplatte K'gel G 1500/LS ₂₅₄	Schleicher & Schüll	250	"
15	Folie K'gel F 1500/LS ₂₅₄	"	200	Polyester
16	Alufolie K'gel SIF	Riedel de Haën	200	Aluminium
17	Folie Chromagram Silicagel UV ₂₅₄	Eastman	100	Polyester
18	Fertigplatte K'gel HF ₂₅₄	Antec	-	Glas
19	Fertigplatte K'gel SL ₂₅₄	"	-	"

2.1.3 Experimentelles

Alle kontrollierbaren Parameter wurden strikte konstant gehalten (= gleiche Aktivierung, gleiche Probelösungen, gleiche aufgetragene Mengen, gleiche Trennstrecken, gleicher Kammertyp). Ausserdem wurden die Arbeiten in einem klimatisierten Raum ausgeführt ($t = 22^{\circ}$; rel. Luftfeuchtigkeit = 55 %).

Zur Prüfung der Trenneigenschaften verwendeten wir folgende willkürlich ausgewählten Substanzgemische (Tab.3) aus verschiedenen Polaritätsbereichen:

Tab. 3

Zur Prüfung von Kieselgelschichten verwendete Substanzgemische

Nr. Zusammensetzung	Fließmittel
1 Lipophiles Farbstoffgemisch, bestehend aus je 50 mg Sudanschwarz (2 Komp), Artisilblau 2 RP, Sudangelb, Ceresviolett (3 Komp), Fettorange, Fettrot 7 B in 10 ml Toluol	Benzol
2 Synthetisches Gemisch von 10 Triazin-Herbiziden (je 10 mg in 10 ml Aceton). Es handelt sich um substituierte symm.Triazin-Verbindungen, wobei $R_1 = Cl, OCH_3, SCH_3$; R_2 bzw. $R_3 = NHC_2H_5$, $NH \cdot C_3H_7, NHC_4H_9$	Toluol-Aceton (85+15)
3 Synthetisches Gemisch von 6 hydrophilen Wirksubstanzen aus verschiedensten Substanzklassen (je 10 mg in 10 ml Methanol-Wasser = 1+1)	Chloroform-Aceton-Eisessig (70+20+10)
4 Synthetisches Gemisch von 6 verschiedenen tetra-substituierten 4,4'-Bis-(Triazinylamino)-stilben-2,2'-disulfosäure-Derivaten, je 10 mg in 10 ml Aceton-Wasser = 7 + 3	Butanol-konz.Ammoniak (85+15)

2.1.4 Besprechung der geprüften Eigenschaften

Wir haben folgende Eigenschaften der Kieselgelschichten geprüft:

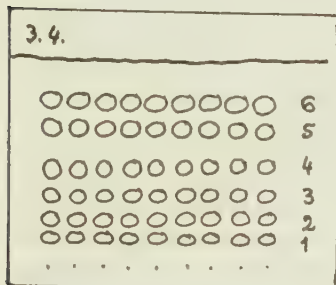
- a) Trenneigenschaften
- b) Verhalten gegenüber Sprühereagenzien
- c) Steiggeschwindigkeit
- d) Regelmässigkeit der Schichtdicke

a) Trenneigenschaften

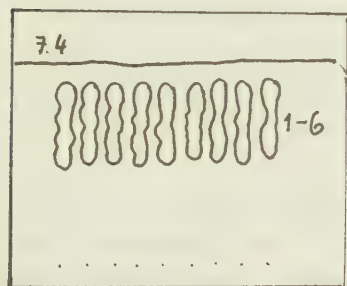
Die drei selbsthergestellten Schichten Nr. 1-3 sind sehr ähnlich und zeigen etwa gleich gute Trennungen. Die käuflichen Schichten haben etwas schlechter abgeschnitten, denn einige davon konnten nicht alle Komponenten der Testgemische trennen. Daraus darf man jedoch nicht die Folgerung ziehen, dass käufliche Schichten schlechter sind als die selbsthergestellten, denn in den erwähnten Beispielen wurde das Fliessmittel jeweils an die selbsthergestellten Schichten angepasst. Nimmt man sich nachher die Mühe und wiederholt die Optimierung auf käuflicher Schicht, so wird es in der Regel möglich, die gewünschte Trennung mit einem neuen Fliessmittel zu erreichen. Ein konkretes Beispiel wird in Fig. 1 präsentiert.

Fig. 1

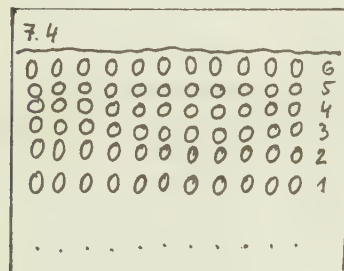
Uebertragung einer Trennung von selbsthergestellter auf käufliche Schicht



- a) Ursprüngliches Chromatogramm, auf selbsthergestelltem Kieselgel G Merck, Fliessmittel: Benzol-konz. Ammoniak (85+15)



- b) Schlechtes Chromatogramm auf käuflicher Schicht (MN-Polygram Folie, SIL-N-HR/UV 254), mit dem gleichen Fliessmittel wie a)



- c) Verbessertes Chromatogramm auf gleicher käuflicher Schicht wie b), jedoch mit einem neuen Fliessmittel = Aceton-Benzol-Diaethanolamin-Wasser (90+25+1+9)

b) Verhalten gegenüber Sprühreagenzien und UV-Licht

Die selbsthergestellten, rein anorganischen Kieselgelschichten sind gegen die Einwirkung von aggressiven Sprühreagenzien und auch von höherer Temperatur unempfindlich. Einige käufliche Schichten hingegen sind empfindlich, weil sie organische Bindemittel enthalten (z.B. Stärke). Auch das Trägermaterial oder vom Verpackungsmaterial aufgenommene Substanzen können zu unerwünschter Verfärbung führen. Deshalb haben wir untersucht, wie sich die käuflichen Schichten gegenüber bekannten Sprühreagenzien verhalten. Auch die Möglichkeit des Nachweises unter kurz- und langwelligem UV-Licht wurde berücksichtigt. Tabelle 4 enthält die geprüften Nachweismöglichkeiten und das entsprechende Verhalten der käuflichen Schichten. Es wurden 3 verschiedene Noten erteilt:

- + = gleich gut wie rein anorganische Schicht, praktisch keine Verfärbung
- x = schlechter als rein anorganische Schicht, aber noch brauchbar. Die merkbare Verfärbung dürfte zu ungünstigeren Nachweisgrenzen führen
- = unbrauchbar, sehr starke Verfärbung.

Nur die Schichten 4 und 5 sind gleich gut wie die rein anorganischen. Die Schichten 8, 12, 13, 18 und 19 haben nur mit je einer Nachweismethode etwas schlechtere Resultate gezeigt. Schicht 17 hingegen war in 5 Fällen unbrauchbar. Die Ergebnisse sind erfreulicherweise günstiger ausgefallen als vor drei Jahren.

Tab. 4

Verhalten gegenüber Sprühreagenzien bzw. UV-Licht

Nachweismethode	Schicht-Nr.																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Konz. Schwefelsäure/140°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	x	+	+	+	+	-	-	+	+
Chromschwefelsäure/RT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phosphormolybdänsäure/120°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Silbernitrat/UV ₂₅₄	+	+	+	+	+	+	+	x	x	x	x	+	+	+	+	x	+	+	+
Berlinerblau Reaktion	+	+	+	+	+	x	x	+	+	+	+	x	x	+	+	+	+	+	+
Chlor-KJ-Stärke	+	+	+	+	+	x	+	-	-	+	+	+	-	-	x	-	x	x	x
Diazotierung + Kupplung	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Jod-Dampf	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
UV ₂₅₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	x	+
UV ₃₆₆	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Anzahl Noten x pro Schicht	0	0	0	0	0	1	2	1	1	1	2	1	1	0	0	2	1	1	1
Anzahl Noten - pro Schicht	0	0	0	0	0	1	1	0	1	2	-	0	0	1	2	2	5	0	0

c) Steigggeschwindigkeit des Fliessmittels

Die Laufzeiten wurden für eine totale Steighöhe von 14 cm gemessen (12+2) und die geprüften Schichten zeigen bedeutende Unterschiede. Am schnellsten sind die Schichten Nr. 17, 11 und 16. Das Verhältnis der Chromatographie-Dauer von der schnellsten zur langsamsten Schicht beträgt bei gleichbleibendem Fliessmittel ca. 1:5. Eine vergleichende Uebersicht über die genauen Laufzeiten gibt die Tabelle 5.

Tab. 5

Laufzeiten für 14 cm Steighöhe

Schicht-Nr.	Fliessmittel			
	Benzol	Toluol-Aceton (85+15)	Butanol-konz. Ammoniak (85+15)	Chloroform-Aceton-Eisessig (70+20+10)
1	32	30	135	65
2	44	40	165	55
3	57	55	200	85
4	61	50	180	90
5	58	62	215	75
6	48	35	240	70
7	41	33	200	60
8	57	48	185	80
9	44	36	190	55
10	69	55	300	95
11	93	70	375	130
12	34	30	160	45
13	20	21	90	30
14	38	30	155	50
15	62	50	270	80
16	80	75	345	105
17	128	90	320	145
18	48	40	190	65
19	37	35	125	50

d) Schichtdicke

Die Schichtdicke jeder Platte wurde an 25 verschiedenen Stellen gemessen. Zur Messung verwendeten wir einen aus der Lackindustrie bekannten Trockenfilm-Dickemesser der Fa. Erichsen/Hemer, Sundwig/Westf., BRD. Die Messwerte zeigen, dass die käuflichen Schichten nicht regelmässiger sind als die selbsthergestellten. Die Resultate sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 6

Schichtdicke

Schicht-Nr.	Schichtdicke in μ (Mittelwert aus $n = 25$)	Spannweite in μ	Relative Standard- abweichung ($n = 25$)
1	260	55	$\pm 4 \%$
2	230	40	$\pm 5 \%$
3	276	50	$\pm 5 \%$
4	251	65	$\pm 7 \%$
5	269	125	$\pm 17 \%$
6	248	95	$\pm 11 \%$
7	183	70	$\pm 10 \%$
8	245	50	$\pm 6 \%$
9	249	75	$\pm 9 \%$
10	302	50	$\pm 4 \%$
11	260	35	$\pm 3 \%$
12	211	60	$\pm 8 \%$
13	250	125	$\pm 16 \%$
14	292	60	$\pm 6 \%$
15	230	40	$\pm 5 \%$
16	172	40	$\pm 5 \%$
17	111	40	$\pm 10 \%$
18	339	150	$\pm 11 \%$
19	211	90	$\pm 11 \%$

2.2 Fliessmittel Normierung

2.2.1 Ausgangslage

Die Fliessmittelwahl erfolgt heute noch immer empirisch und aus diesem Grund wird der Dünnschichtchromatographie von vielen Seiten vorgeworfen, sie sei eine unwissenschaftliche Probiertechnik. Es stimmt tatsächlich, dass bis jetzt noch niemand in der Lage ist, anhand theoretischer Kenntnisse die Trennbedingungen von zwei ähnlichen Verbindungen (z.B. Isomeren, Homologen) sicher vorauszusagen. Grundlegende theoretische Arbeiten von SNYDER [1], GIDDINGS [2] haben zwar wichtige Erkenntnisse über die Wechselwirkung zwischen Sorptionsmittel/Fliessmittel/Substanz gebracht, aber diese sind nicht in einfachen Regeln zusammenfassbar und helfen bei der Fliessmittelwahl nicht weiter.

Nur bei der Trennung zweier ganz verschiedener Verbindungen sind grobe Voraussagen möglich, nämlich anhand der Kenntnis der sogenannten "eluotrope Reihe" der Lösungsmittel nach TRAPPER [3], WREN [4], STRAIN [5], SNYDER [1], oder der Zuordnung der organischen Verbindungen nach ihren Adsorptionseigenschaften von BROCKMANN und VOLTPE [6].

Eine wichtige Hilfe in der Fliessmittelwahl sind die DC-Monographien von STAHL [7], RANDEATH [8], BOBBIT [9], TRUTER [10], KIRCHNER [11], welche die Trennbedingungen nach Substanzklassen geordnet katalogisieren. Die darin befindlichen Fliessmittel-Angaben werden meistens nur als Ausgang zur Optimierung neuer Kombinationen verwendet. Jeder chromatographisch tätige Praktiker hat seine eigene Suchmethode entwickelt und dies führte zu einer wenig erfreulichen, undurchschaubaren Situation. Eine Anzahl von ca. 50 verschiedenen Lösungsmitteln wurden zu unüberschaubar vielen Kombinationen verwendet. Im Falle von Kieselgel, dem meist benützten DC-Sorptionsmittel, bestehen die Fliessmittel meistens aus 2-4 Komponenten, seltener aus > 4 oder 1.

2.2.2 Normierungsversuch

Wir analysierten die Situation im eigenen Labor. Aus 3'160 verschiedenen DC-Vorschriften verwendeten wir in 2'860 Fällen (> 90 %) Kieselgel als Sorptionsmittel. Gemäss diesen 2'860 Vorschriften verwendeten wir 499 verschiedene Fliessmittel. Das bedeutet, dass jedes Fliessmittel durchschnittlich 6 mal eingesetzt wurde. Die Verteilung war sehr unregelmässig, denn während einige wenige Fliessmittel zwischen 60 bis 300 mal verwendet wurden, konnten 252 verschiedene Fliessmittel nur je 1 mal und 82 Fliessmittel nur je 2 mal eingesetzt werden.

Wir versuchten aus den 499 verschiedenen Fliessmitteln eine beschränkte Anzahl von nur 12 auszuwählen. Mit Hilfe dieser Standardfliessmittel sollte es möglich sein, einen grossen Anteil der zukünftigen Trennprobleme zu lösen. Die Auswahl (vergl. Tab. 7) führten wir nach folgenden Kriterien aus:

- es sollen die am häufigsten vorkommenden Fliessmittel gewählt werden
- die Fliessmittel sollen max. 3 Komponenten enthalten. (Wegen der Reproduzierbarkeit empfiehlt GEISS [12] einkomponentige Fliessmittel zu verwenden. Andererseits zeigen mehrkomponentige Fliessmittel öfters bessere Selektivität.)
- auf das häufig benützte Benzol soll aus hygienischen und auf chlorierte Kohlenwasserstoffe aus oekologischen Gründen verzichtet werden
- die Standardfliessmittel sollen das ganze Gebiet von apolar bis stark polar überdecken, da Proben aus verschiedensten Substanzklassen zu erwarten sind.

Tab. 7

Liste der vorgeschlagenen DC-Standardfliessmittel für Kieselgel

Nr.	Zusammensetzung
1	n-Hexan
2	" -Essigester (95+5)
3	" " (90+10)
4	" " (70+30)
5	" " (50+50)
6	" " (30+70)
7	Toluol-Essigsäure (90+10)
8	" " (70+30)
9	Essigester-Pyridin-Wasser (70+25+20)
10	Toluol-Essigsäure-Wasser (50+50+5)
11	Essigester-Essigsäure-Wasser (60+20+20)
12	n-Butanol-konz. Ammoniak (85+15)

2.2.3 Erste Erfahrungen mit den Standardfliessmitteln

Während einer Periode von 6 Monaten haben wir bei jedem neuen Trennproblem zuerst die Standardfliessmittel verwendet. Von 207 Fällen bewährte sich in 128 Fällen das Standardsystem, was einer Erfolgsrate von 62 % entspricht. Wir wollen nicht behaupten, dass die vorgeschlagenen Standardfliessmittel auch in jedem anderen Labor zur gleichen Erfolgsrate führen. Aber auch anderswo würde es sich lohnen, in ähnlicher Weise vorzugehen und eine Liste von Standardfliessmitteln für die jeweils vorkommenden Substanzklassen zusammenzustellen.

2.3 Erkennung von chromatographischen Artefakten

2.3.1 Problemstellung

In der Regel entspricht jeder DC-Fleck einer tatsächlich vorhandenen Komponente in der Probe. Es kommt jedoch ab und zu vor, dass sich die Probe entweder in der Lösung oder anschliessend auf der Trennschicht zersetzt (z.B. wegen Oxydation, Hydrolyse, Reaktion mit Lösungsmittel- bzw. Fließmittel-Komponenten, etc.). Dadurch entstehen zusätzliche DC-Flecken, welche keiner reellen Komponente entsprechen. Solche chromatographischen Artefakte sind nicht ohne weiteres erkennbar. Im folgenden wird gezeigt, wie man solche Artefakte mit etwas zusätzlichem Aufwand feststellen kann.

2.3.2 Zersetzung der Probe in der Lösung

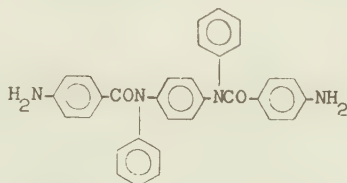
Eine Zersetzung in der Lösung lässt sich am einfachsten erkennen, wenn man eine ganz frische und eine alte Probeflösung nebeneinander aufträgt und chromatographiert. Falls das der alten Lösung entsprechende Chromatogramm zusätzliche DC-Flecken aufweist, so sind diese auf eine Zersetzung der Probe zurückzuführen. Bei der Untersuchung von mehreren hundert Forschungspräparaten aus verschiedensten Stoffklassen stellten wir in mehr als 10 % der Fälle eine merkbare Zersetzung bei Probeflösungen fest, die man nur wenige Stunden bei Raumtemperatur hatte stehen lassen.

Die Stabilität der Probe ist jedoch nicht nur vom Alter der Lösungen, sondern auch von der Art des jeweils verwendeten Lösungsmittels abhängig. Auch der Reinheitsgrad des Lösungsmittels kann bestimmend sein, z.B. der Peroxid-Gehalt von Aether oder Dioxan, der Phosgen- oder Aethanol-Gehalt von Chloroform, der Wasser-Gehalt von Aethanol, etc. Man kann zusätzliche Informationen gewinnen, indem man die Probe in verschiedenen Lösungsmitteln löst und diese nebeneinander chromatographiert.

Beispiel

Als Beispiel von einer Zersetzung in der Lösung soll die DC-Reinheitsprüfung eines Forschungspräparates der Fa. Ciba-Geigy AG dienen.

Chemische Struktur:



Das Präparat wurde in Aceton-Ameisensäure (99+1) gelöst und auf Kieselgel-G-Schicht chromatographiert. Mit dem Fließmittel Toluol-Essigester-Methanol (50+50+5) erhielten wir 3 gleich starke DC-Flecken (vergl. Fig. 2). Wir schenkten diesem ersten Befund keinen Glauben und wiederholten das Chromatogramm mit ganz frischer Lösung. Das Resultat war eindeutig: die frische Lösung zeigte praktisch nur einen DC-Fleck, während die alte Lösung wieder 3 Flecken zeigte.



Fig. 2

Komparative DC-Prüfung eines Forschungspräparates mit frischer und alter Probelösung.

Legende:

1. Alte Probelösung (5 h bei Raumtemperatur)
2. Ganz frische Probelösung

2.3.3 Zersetzung der Probe auf der Trennschicht

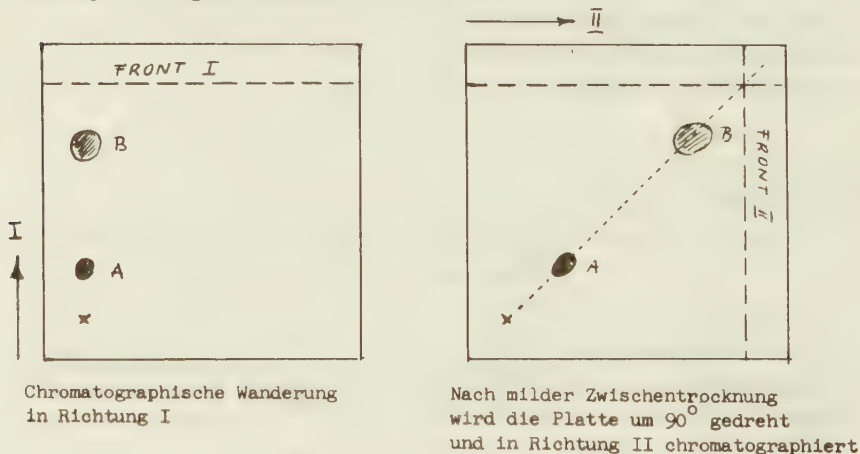
Zersetzungen auf der Schicht können mit der bekannten Diagonal-Technik, oder noch besser mit dem neu entwickelten DC-DC-Trockentransfer nachgewiesen werden.

Diagonal-Technik

Die sogenannte Diagonal-Technik ist schon von der Papierchromatographie her bekannt und wurde von BRENNER et al. [13] und HALL und MACEK [14] beschrieben. Mit Diagonal-Technik bezeichnet man die aufeinanderfolgende chromatographische Trennung eines Substanzgemisches mit demselben Fließmittel in beiden Richtungen. In folgender Figur wird das Prinzip dieser eleganten Methode schematisch dargestellt.

Fig. 3

Prinzip der Diagonal-Technik



Falls sich die Probe während der chromatographischen Trennung nicht zersetzt, so sollten sich die DC-Flecken am Ende des II. Laufes auf einer imaginären Diagonale befinden, welche den Startpunkt mit dem Schnittpunkt beider Lösungsmittelfronten verbindet.

Befindet sich hingegen eine kompakte Zone ausserhalb der Diagonale, so bedeutet das eine Zersetzung der Probe auf der Schicht, noch vor Beginn der chromatographischen Wanderung. Eine "Schwanzbildung" ausserhalb der Diagonale zeigt eine Zersetzung während der chromatographischen Wanderung an.

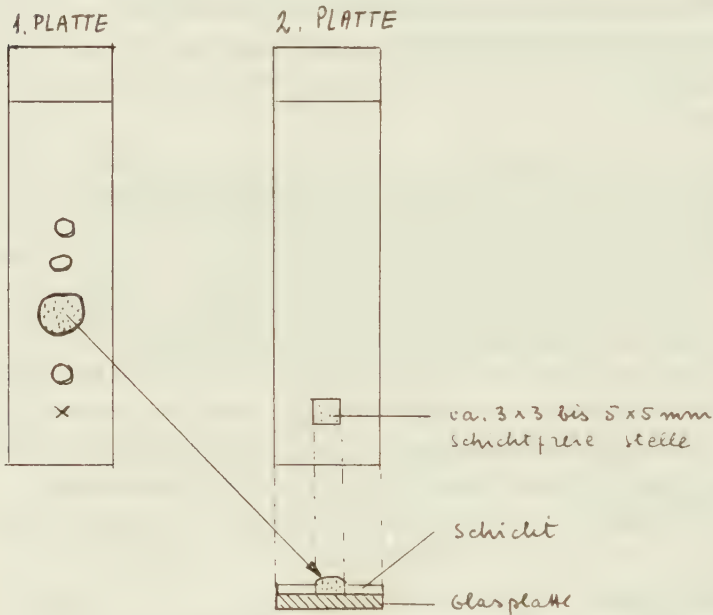
Die Diagonal-Technik gibt hauptsächlich dann klare Resultate, wenn das Fliessmittel aus apolaren und flüchtigen Lösungsmitteln zusammengestellt ist. Chromatographiert man jedoch mit nicht flüchtigem, polare Komponenten enthaltendem Fliessmittel, wie z.B. Butanol, Essigsäure, Pyridin, Wasser, etc., dann werden die chromatographischen Bedingungen vom zweiten Lauf verschieden sein, denn nach milder Zwischentrocknung können die Lösungsmittelreste nicht vollständig entfernt werden. Eine scharfe Trocknung kommt anderseits aus Gründen der möglichen Zersetzlichkeit der Probe nicht in Frage. Im besten Fall ist die Diagonale keine Gerade, sondern ein Bogen. Aber manchmal sind die Zonen stark verformt, so dass die Chromatogramme keine sichere Aussage über die eventuelle Zersetzung der Probe ermöglichen.

DC-DC-Trockentransfer

Die Zersetzung der Probe auf der Schicht kann am einfachsten mit der von SZEKELY [15] beschriebenen DC-DC-Trockentransfer-Technik nachgewiesen werden. Dazu braucht man zwei DC-Platten und es wird auf folgende Weise vorgegangen: Die Probe wird auf eine erste DC-Platte chromatographiert, und die Zonen werden zerstörungsfrei lokalisiert, z.B. durch Fluoreszenzlöschung, Eigenfluoreszenz oder Eigenfärbung. Auf einer zweiten, frischen Platte wird am Start, ca. 1,5 cm vom unteren Plattenrand entfernt, eine Fläche von 3 x 3 bis 5 x 5 mm Schicht weggekratzt. Der Hauptfleck wird aus der eben trocken gewordenen Schicht der ersten Platte herausgeschabt, in die schichtfreie Stelle der zweiten Platte überführt und mit einem Spatel angedrückt (vergl. Fig. 4). Dann wird diese zweite Platte mit dem gleichen Fliessmittel wie die erste Platte chromatographiert.

Fig. 4:

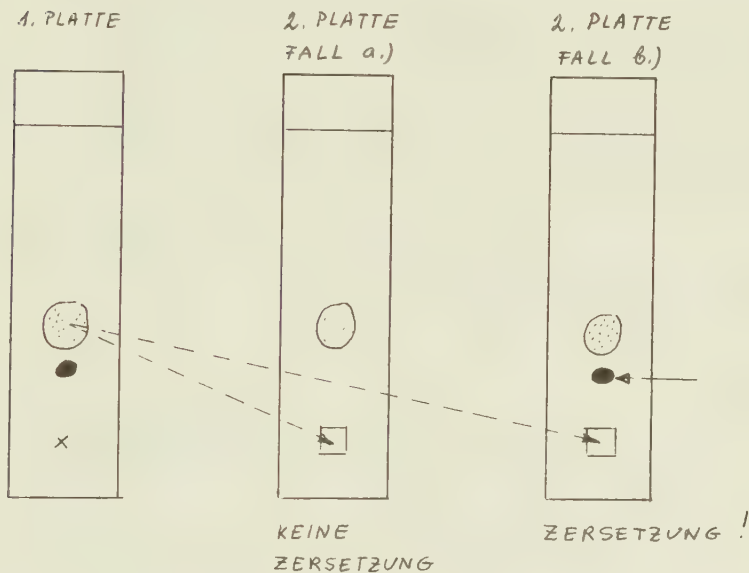
Schematische Darstellung des DC-DC Trockentransfer



Mit dieser Technik haben wir bereits viele hundert DC-Vorschriften überprüft und dabei mehrere Zersetzungen diagnostiziert. Wenn die transferierte Hauptzone auf der zweiten DC-Platte nur einen einzigen Fleck zeigt, so ist die Vorschrift in Ordnung und die Nebenflecken der ersten Platte können als echte Verunreinigungen betrachtet werden. Falls jedoch nebst der transferierten Hauptzone noch Nebenzonen feststellbar sind, so ist die Vorschrift mangelhaft. Die Probe hat sich auf der Schicht zersetzt und folglich müssen weitere Trennbedingungen gesucht werden (vergl. Fig. 5).

Fig. 5:

Nachweis evtl. Zersetzung der Probe mittels DC-DC Trockentransfer



Das Ausfüllen der Startstelle mit dem ausgekratzten, losen Schichtmaterial (= Hauptzone aus erster DC-Platte) verursachte nach unseren Erfahrungen weder Rf-Wert-Verschiebungen noch sonstige Schwierigkeiten.

Gegenüber der zweidimensionalen Diagonal-Technik bietet der Trockentransfer folgende Vorteile:

- er ist mit allen möglichen Fließmitteln ausführbar; auch schwer flüchtige, polare Lösungsmittel stören nicht,
- er bietet die Möglichkeit, mehrere Proben auf derselben Platte zu untersuchen.

2.4. Zuordnung von chromatographischen Zonen

Da bei der DC-Reinheitsprüfung manchmal ein einziges System nicht alle Verunreinigungen abtrennt, werden die Proben oft mit zwei verschiedenen Fließmitteln chromatographiert. Dabei können Rf-Wert-Inversionen eintreten und es stellt sich die Frage, welche Zone des einen Chromatogrammes mit welcher Zone des anderen übereinstimmt. Bekannte Komponenten können zwar durch Mitchromatographieren von authentischen Vergleichssubstanzen zugeordnet werden. Stehen jedoch solche Präparate nicht zur Verfügung, oder handelt es sich um Komponenten mit unbekannter chemischer Struktur, so kann die Zuordnung der Zonen mit der bereits beschriebenen DC-DC-Trockentransfer-Technik von SZEKELY [15] realisiert werden.

Beispiel

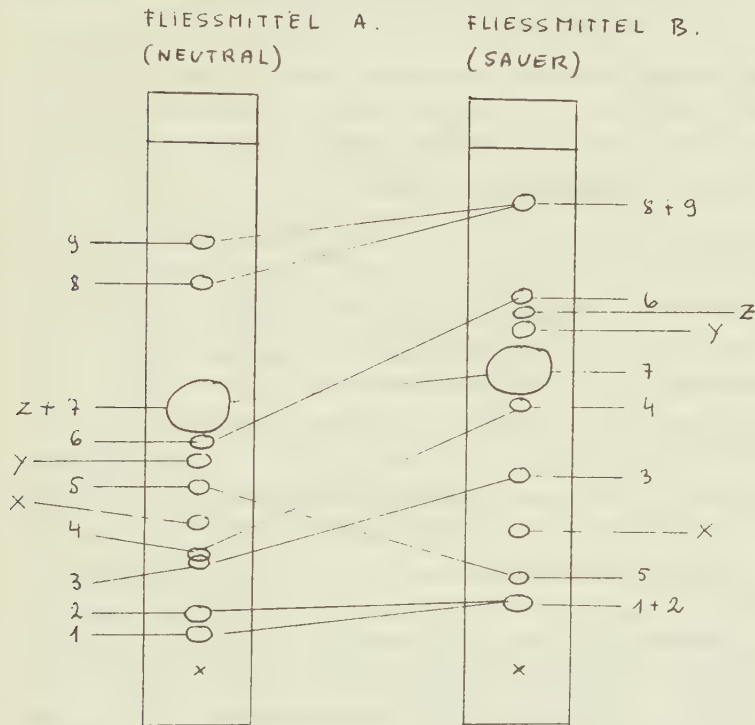
Als Beispiel wird die DC-Trennung eines vielkomponentigen Triazin-Gemisches gezeigt, welches auf Kieselgel G Schicht mit 2 verschiedenen Fließmitteln chromatographiert wurde.

- A. Neutrales Fließmittel, bestehend aus Tetrachlorkohlenstoff-Essigsäureäthylester-Chloroform (60+20+40)
- B. Saures Fließmittel, bestehend aus Toluol-Chloroform-Acetonitril-Eisessig (60+20+20+2)

Das Triazin-Gemisch wurde zuerst mit dem Fließmittel A auf eine erste DC-Platte chromatographiert. Nach der zerstörungsfreien Lokalisierung der Zonen (UV₂₅₄) wurden die einzelnen Zonen des Gemisches ausgekratzt und auf eine zweite DC-Platte transferiert. Zwischen den einzelnen trocken-transferierten Zonen wurde das ursprüngliche Gemisch aus Vergleichszwecken mehrmals aufgetragen. Die schematische Zuordnung der einzelnen Komponenten wird in Fig. 6 gezeigt.

Fig. 6:

Zuordnung der einzelnen Komponenten eines Triazin-Gemisches mittels
DC-DC Trockentransfer



Legende

- 1 = 4,6-bis(Aethylamino)-2-tert.butylamino-s-triazin
- 2 = 6-Aethylamino-2,4-bis(tert.butylamino)-s-triazin
- 3 = 4-Aethylamino-2-tert.butylamino-6-methoxy-s-triazin
- 4 = 2,4-bis(Aethylamino)-6-methylthio-s-triazin
- 5 = 2,4,6-tris(tert. Butylamino)-s-triazin
- 6 = 6-Aethylamino-2-tert.butylamino-4-chlor-s-triazin
- 7 = 4-Aethylamino-2-tert.butylamino-6-methylthio-s-triazin (= Hauptkomponente)
- 8 = 2-Aethylamino-4,6-bis(methylthio)-s-triazin
- 9 = 2,4-bis(tert. Butylamino)-5-methylthio-s-triazin
- X = unbekannte Nebenkompente (Spuren)
- Y = " " "
- Z = " " "

2.5 Literatur

- [1] L.R. SNYDER, Principles of Adsorption Chromatography, M. Dekker, New York, 1968
- [2] J.C. GIDDINGS, Dynamics of Chromatography, I, M. Dekker, New York, 1965
- [3] W. TRAPPE, Biochem. Ztg., 305.150 (1940)
- [4] J.J. WREN, J. Chromatogr., 4.173 (1960)
- [5] H.H. STRAIN, Chromatographic Adsorption Analysis, Interscience, New York, 1945
- [6] H. BROCKMANN, F. VOLPES, Chem. Ber., 82.95 (1949)
- [7] E. STAHL, Dünnschicht-Chromatographie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967
- [8] K. RANDEKATH, Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim, 1965
- [9] J.M. BOBBIT, Thin-Layer Chromatography, Reinhold Publishing Corp., London, 1963
- [10] E.V. TRUTER, Thin-Film Chromatography, Cleaver-Hume Press Ltd., London, 1963
- [11] J.G. KIRCHNER, Thin-Layer Chromatography, Interscience Publishers, New York, London, Sydney, 1967
- [12] F. GEISS, Die Parameter der Dünnschichtchromatographie, Vieweg Verlag, Braunschweig, 1972
- [13] M. BRUNNER, H.R. MUELLER, E. LICHTENBERG, Helv. 35.217 (1952)
- [14] J.M. HALL, K. MACEK, Handbuch der Papierchromatographie, Fisher Verlag, Jena, 1963, Band I, 5.152
- [15] G. SZEKELY, J. Chromatogr., 42.543 (1969)

3. IDENTIFIZIERUNG DER CHROMATOGRAPHISCH GETRENNTEN KOMPONENTEN

Mit Hilfe von Farbreaktionen und Rf-Wert-Angaben kann man einige Informationen betreffend der chemischen Struktur einer unbekannten Komponente gewinnen. Solche Versuche werden in Kapitel 3.1. kurz erwähnt. Eine einwandfreie Identifikation gelingt jedoch meistens nur mit Hilfe von spektroskopischen Methoden. Solche Methoden werden in den nachfolgenden Kapiteln 3.2. bis 3.4. eingehend behandelt.

3.1. Identifizierung durch Farbreaktionen und Rf-Werte

Eine erste Information liefern der Rf-Wert und das verwendete DC-System, weil man durch sie die Polarität der Komponente kennen lernt. Wandert z.B. eine mit Benzol chromatographierte Komponente auf Kieselgelschicht mit mittlerem bis grossem Rf-Wert, so schliesst man daraus, dass es sich um eine lipophile Verbindung handelt, etwa um einen Kohlenwasserstoff oder dessen Halogen-Derivat. Bleibt die Komponente am Start, so weiss man, dass es sich um eine polare Verbindung handelt.

Bei synthetisch hergestellten Substanzen kann man überlegen, was für Nebenreaktionen möglich sind und zu welchen Nebenkomponten sie führen. Falls authentische Vergleichspräparate vorhanden sind, sollte man diese auf der gleichen Platte mitchromatographieren und den Rf-Wert mit der unbekannten Komponente vergleichen. Man darf jedoch nicht vergessen, dass die Rf-Identität zweier Komponenten noch lange nicht die Identität der chemischen Strukturen bedeutet. Die Sicherheit der Aussage wird erhöht, indem man nicht ein einziges, sondern mehrere - möglichst verschiedene - DC-Systeme verwendet. Nebst dem Rf-Wert sind die Eigenfarbe oder die Fluoreszenzfarbe im UV-Licht ein wertvolles Indiz. Ausserdem gibt es einige mehr oder weniger spezifische Farbreaktionen, welche die An- oder Abwesenheit gewisser funktioneller Gruppen anzeigen. Als Beispiel erwähne ich in der Tabelle 1 einige spezifische Farbreaktionen. Die genaue Herstellung der Sprühreagenzien und die Ausführung findet man in verschiedenen Monographien, wie z.B. KIRCHNER [1], RANDERATH [2], STAHL [3].

Tab. 1

Einige spezifische Farbreaktionen

Bezeichnung	Substanzklasse
Diazotierung und Kupplung	prim. aromatische Amine
Reduktion mit Titan-III-chlorid, anschliessend Diazotierung und Kupplung	aromatische Nitro-Verbindungen
p-Dimethylaminobenzaldehyd	prim. aromatische u. aliphatische Amine
Chlor-Kaliumjodid-Tolidin	prim. und sek. Amine (aliphatisch u. aromatisch)
Pinakryptolgelb	aliphat. und aromatische Sulfonsäuren
Eisen-III-chlorid	Phenole, Hydroxamsäuren
Bromkresolgrün	Carbonsäuren
2,4-Dinitrophenylhydrazin	Aldehyde u. Ketone
Dragendorff Reagens	Stickstoffhaltige Heterozyklen

3.2. Identifizierung durch IR, MS, NMR, Mikroanalyse, nach der präparativen DC-Trennung

Eine sichere Strukturaufklärung von unbekannten Substanzen gelingt meistens nur durch Verwendung von spektroskopischen Methoden, wozu man jedoch reine Substanzproben benötigt. Darum sind im Falle von Gemischen die chromatographischen Trennmethoden unentbehrlich. Die Aufklärung komplizierter organischer Verbindungen wird erleichtert, wenn man sich nicht nur auf eine, sondern auf mehrere spektroskopische Methoden stützen kann. In der Regel verwendeten wir die Infrarotspektroskopie, die Massenspektroskopie und die Kernresonanzspektroskopie. Die UV-Spektroskopie ist wenig aussagekräftig und die Mikro-Elementaranalyse hat seit dem Aufkommen der Massenspektroskopie ziemlich an Wichtigkeit verloren.

Falls man eine ganz unbekannte Komponente aufzuklären hat, ist es von Vorteil, wenn man eine Menge von ca. 50 mg Substanz isolieren kann. Die Aufklärung kann in speziellen Fällen auch mit kleineren Substanzmengen ausgeführt werden, doch sollte man, wenn möglich, immer mehr Substanz isolieren als unbedingt notwendig ist. Je nach Anteil der Komponenten kann die Isolierung von 50 mg Substanz sehr viel oder auch sehr wenig Arbeit bedeuten. Im Falle einer 0,1 %igen Nebenkomponte muss man 50 g Gemisch aufarbeiten, bei einer 50 %igen Komponenten hingegen nur 0,1 g (ohne Berücksichtigung der Substanzverluste).

Dieses Beispiel zeigt, dass die Isolierung umso schwieriger und zeitraubender wird, je kleiner der prozentuelle Anteil der zu isolierenden Komponente ist.

3.2.1 Die DC als präparative Trennmethode

Die präparative Dünnschichtchromatographie - auch präparative Schichtchromatographie oder Dickschichtchromatographie genannt - kann mit der klassischen präparativen Säulenchromatographie verglichen werden, denn sie ermöglicht die Trennung von Stoffgemischen im Gramm-Bereich. Die optimale Schichtdicke liegt bei 1-2 mm gegenüber 0,25 mm der analytischen Schichten. Als Plattenformat wird 20x20, 40x20 oder sogar 100x20 cm verwendet. Die Chromatographiekammern fassen 2 - 25 Platten. Aufgrund ihrer Vorteile, wie z.B. kleiner Zeitaufwand bei der Optimierung der Trennung sowie besserer Trennschärfe, wird die präparative DC gegenüber der präparativen Säulenchromatographie bevorzugt.

Die Herstellung der dicken Schichten

Im Prinzip kann man alle von der analytischen DC bekannten Sorptionsmittel auch für die präparative DC verwenden. Die Schwierigkeit liegt meistens beim Trocknen, weil die aus gewöhnlichen Sorptionsmitteln hergestellten dickeren Schichten zur Rissbildung neigen. Manchmal kann durch sehr lange Trocknung bei Raumtemperatur, z.B. 1-2 Tagen, die Rissbildung vermieden werden. Noch besser ist es, speziell für dicke Schichten hergestellte Sorptionsmittel zu verwenden. Solche sind z.B. bei der Fa. Merck erhältlich und sind mit dem Buchstaben P gekennzeichnet (P = präparativ), wie Kieselgel PF 254, Kieselgel PF 254 + 366, Kieselgel PF 254 gipshaltig, Kieselgel PF 254 silanisiert, Aluminiumoxyd PF 254 (Typ E oder T). Ähnlich wie bei den analytischen Schichten wird die Suspension aus 1 Teil Sorptionsmittel und 2 Teilen Wasser hergestellt. Kieselgel PF 254 gilt heute als ein universelles Sorptionsmittel für präparative Zwecke und ist widerstandsfähig gegen Abblättern, auch bei mehrfacher Entwicklung mit stark polaren Fließmitteln. Ausser Kieselgel und Aluminiumoxyd sind keine weiteren speziellen Sorptionsmittel für präparative Zwecke im Handel. Wenn man z.B. Cellulose verwenden will, dann muss man versuchen, mit der analytischen Qualität zu arbeiten. Erfahrungsgemäss lassen sich auch 0,5 mm Celluloseschichten herstellen, wenn man die Suspension nicht wie gewohnt in Wasser, sondern in

Aethanol ausführt (30 g Cellulosepulver gipsfrei + 180 ml Aethanol). Die analytischen DC-Platten werden meistens 10 min bei Raumtemperatur vorgetrocknet und dann ca. 30-45 min bei 105°C aktiviert. Sie weisen dann einen Wassergehalt von 3-5 % auf. Wie bereits angetönt wurde, müssen dickere Schichten längere Zeit vorgetrocknet werden, um Risse zu vermeiden. Wir haben die Trocknung der 1 mm Kieselgel PF 254-Schichten bei Raumtemperatur und ca. 50 % rel. Feuchtigkeit (Vollklimatisierung) durch Messen des Wassergehaltes nach K. Fischer kontrolliert:

Tab. 2

Trocknung der Kieselgelschichten bei Raumtemperatur

Zeit	Wassergehalt
sofort nach Beschichtung	66,0 %
nach 12 h	47,5 "
nach 1 Tag	41,9 "
nach 2 Tagen	10,2 "
nach 3 Tagen	8,8 "
nach 5 Tagen	9,0 "

Dieser Versuch zeigt, dass die Schichten, obwohl sie ein trockenes Aussehen aufweisen, auch nach 5 Tagen nicht den gewünschten Wassergehalt von 3-5 % erreicht haben. Diesen erreicht man am besten durch 1-tägiges Vortrocknen bei Raumtemperatur und anschliessend ca. 1 h Aktivierung bei 110°C im Trockenschrank mit Luftumwälzung. Dank der langsamen Vortrocknung verhindert man das Abblättern der Schicht. Die grossen 100x20 cm Platten haben keinen Platz in den gewöhnlichen Trockenschränken, doch sind spezielle Trockenschränke für dieses Format erhältlich (z.B. bei der Fa. Shandon Scientific, London). Falls spezielle Trockenschränke fehlen, kann man die Aktivierung auf folgende Weise improvisieren:

Man legt die 100x20 cm Platten (meistens 5 Stück pro Gestell) in die leere Chromatographiekammer. Die obere Oeffnung wird mit Glasplatten so abgedeckt, dass an beiden Enden je ein 2-4 cm breiter Luftschlitz frei bleibt. Dann wird mit einem handelsüblichen Haushalt-Heizluftventilator (z.B. Astron Silenta AO24-2000 W, Fa. A. Sprenger, BRD) ca. 3 h heisse Luft durchgeblasen. Wir haben die Trocknung von 1 mm Kieselgel PF 254-Schicht auch mit diesem Heizluftventilator kontrolliert:

Tab. 3

Trocknung der Kieselgelschichten mit Heizluftventilator

Zeit	Wassergehalt
12 h Vortrocknen	47,5 %
1 h mit Heizluftventilator	19,2 "
2 h "	3,2 "
3 h "	3,2 "

Die Schichtdicke der aktivierten Platten ist mit der Schichtdicke-Einstellung des Streichgerätes nicht identisch. Aus einer mit 1 mm Spalt gestrichenen Kieselgel PF 254-Schicht wird nach dem Trocknen eine 0,7 mm-Schicht. Ein Zusammenschrumpfen der Schicht kann man bei allen Sorptionsmitteln beobachten. Manchmal ist es von Nutzen, die trockene Schichtdicke zu messen, um einerseits das Zusammenschrumpfen und andererseits die Regelmässigkeit der Schichtdicke an verschiedenen Punkten zu kontrollieren. Zur Messung verwenden wir einen aus der Lackindustrie bekannten Trockenfilm-Dickenmesser (hergestellt von der Fa. Erichsen/Hemer, Sundwig/Westf. BRD). Damit die beiden Füsse nicht in die relativ weiche Schicht eindringen, kann eine Rasierklinge auf die Prüfstelle aufgelegt werden. Die Stärke der Rasierklinge ist vom Messergebnis abzuziehen.

Lösen und Auftragen des Stoffgemisches

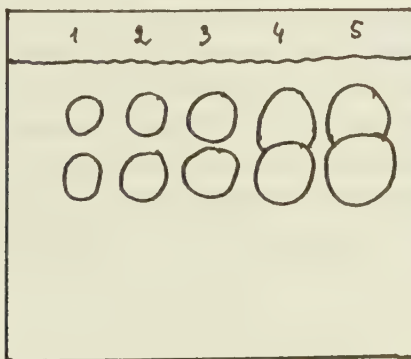
Die zu trennenden Gemische werden in leicht flüchtigen Lösungsmitteln wie Petroläther, Cyclohexan, Methylenchlorid, Chloroform, Essigester, Aceton usw. gelöst, damit das Lösungsmittel bereits bei Raumtemperatur rasch verdunstet. Mit Vorteil werden apolare Lösungsmittel verwendet, damit sich die Substanzzone möglichst wenig verbreitet. Die günstigste Konzentration der Lösungen liegt bei 5 Gew.-%.

Die maximale Beladung, welche noch eine angemessene Trennung gewährleistet, muss von Fall zu Fall experimentell bestimmt werden. Dabei kann so vorgegangen werden, dass man steigende Substanzmengen auf verschiedene Platten aufträgt, chromatographiert und dann feststellt, ob die Trennung genügt oder nicht. Die folgende Arbeitsweise ist jedoch eleganter: man bestimmt mit Hilfe einer einzigen DC-Platte die maximale Beladung indem man punktförmig steigende Substanzmengen aufträgt und die jeweiligen Verhältnisse von Substanz zu Sorptionsmittel berechnet.

Z.B. werden auf eine 20x20 cm Platte, beschichtet mit 1 mm Kieselgel, verschiedene Substanzmengen eines Gemisches chromatographiert (Laufstrecke = 15 cm). Eine solche Platte enthält ca. 15 g Sorptionsmittel (entspricht 37 mg/cm^2) und aus der Fläche der Laufbahnen berechnet man die Sorptionsmittelmenge bzw. das oben erwähnte Verhältnis:

Fig. 1

Beladung der Kieselgelschichten mit steigenden Substanzmengen



Tab. 4

Quantitative Angaben über die Belastung der Kieselgelschichten mit der Probe

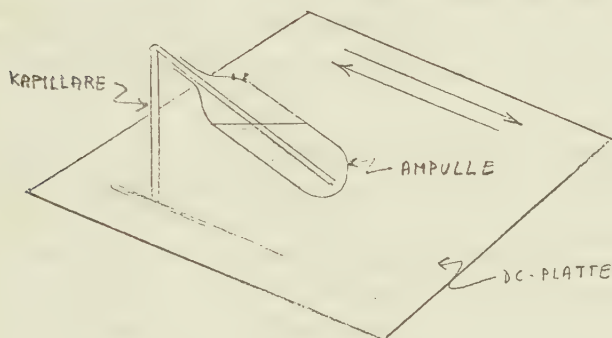
Bahn Nr.	aufgetragene Menge (mg)	Bahnfläche (cm ²)	Sorptionsmittel (mg)	Verhältnis Stoffgemisch-Sorptionmittel
1	5	21	780	1 : 156
2	10	24	890	1 : 90
3	15	30	1'100	1 : 74
4	20	31	1'150	1 : 58
5	25	33	1'220	1 : 50

Die Trennung von Bahn Nr. 3 führt zu einer vollständigen Auflösung. Aus dem Verhältnis 1 : 74 berechnet man die aufzutragende Stoffgemisch-Menge von 150 mg. Dabei ist noch zu bemerken, dass solch günstige Verhältnisse nur im Falle von apolaren Stoffen vorkommen. In weniger günstigen Fällen arbeitet man mit Verhältnissen von 1 : 500 oder noch schlechteren.

Das Auftragen der Substanzlösung erfolgt bei der präparativen DC linienmässig. Dafür gibt es mehrere speziell entwickelte und kommerziell erhältliche Auftrage-Geräte, wie z.B. den Chromatocharger nach Firmenich (Camag AG, Muttenz BL), Autoliner nach Stahl (Desaga, Heidelberg), Microdoser[®] nach Dibern (Desaga, Heidelberg), etc. Ausserdem gibt es eine billige improvisierte Lösung nach MONTEIRO [4], welche sich bei uns sehr gut bewährt hat. Das Vorratsgefäss besteht aus einer Glasampulle, und die Substanzlösung wird mit Hilfe einer im Winkel gebogenen, leichteren Glaskapillare aufgetragen. Man schiebt die Glasplatte hin und her, denn die Kapillare ist so leicht, dass sie die Schicht nicht verletzen kann.

Fig. 2

Einfaches System z. linienmässigen Auftragung nach MONTEIRO /4/



Chromatographieren

Bei der präparativen Dünnschichtchromatographie arbeitet man ausschliesslich nach dem aufsteigenden Verfahren. Als Trennkammer kann man auch die gewöhnlichen eckigen Glaskammern (= N-Kammer) verwenden. Da aber zur Lösung eines Problems meistens viele Platten erforderlich sind, haben sich diejenigen Kammern bewährt, welche mehrere Platten auf einmal aufnehmen können. Im Handel gibt es solche für 6-24 Platten, in den Formaten 20x20, 20x40 und sogar 20x100 cm. Die Schicht einer Platte kommt gegen die Rückseite der nächsten Platte zu liegen. Der Abstand zwischen der Schicht und der nächsten Glasplatte beträgt, je nach Konstruktion des Gestells, zwischen 2-20 mm. Es kommt vor, dass kritische Substanzpaare in einer N-Kammer gut trennen, aber in den "Multiplate"-Kammern schlechtere oder überhaupt keine Trennung mehr zeigen. Die Ursache ist in den veränderten Sättigungsbedingungen zu suchen. In einer solchen Situation ist es berechtigt, die Trennung in vielen N-Kammern auszuführen, denn eine Optimierung der Trennung in der Multiplate-Kammer würde sich kaum lohnen.

Tab. 5

Die wichtigsten Merkmale einiger kommerziell erhältlicher Mehrfach-Trenn-Kammern

Bezeichnung	Hersteller	Platten		Abstand zwischen Schicht und der nächsten Platte (mm)
		Anzahl	Format (cm)	
Multi-Sandwich System	Camag (MuttENZ)	5	20x20	2-3
Multiplate-Kammer	Desaga (Heidelberg)	24	20x20	ca. 18
Multiplate-Kammer	Desaga (Heidelberg)	11	20x40	ca. 18
Multiplate Chromatank	Shandon (London)	7	20x20	ca. 18
PLC Chromatank *	Shandon (London)	5	100x20	ca. 18

* hergestellt aus nichtrostendem V₄A-Stahl.

Die Grundlage jeder präparativen Trennung ist die analytische Dünnschichtchromatographie, denn die analytischen Systeme lassen sich direkt oder mit wenig Änderung auf den präparativen Massstab übertragen. Ausserdem braucht man die analytische Dünnschichtchromatographie zur Kontrolle der getrennten Zonen. Wie bereits erwähnt, ist Kieselgel PF 254 Merck das meistgebrauchte Schichtmaterial für präparative Trennungen auf 1-2 mm Schichten. Im Vergleich zu Kieselgel G ist die PF-Sorte ein wenig aktiver. Während bei den analytischen Arbeiten die Beladungskapazität der Schicht nur selten voll ausgenützt wird, sollte man bei präparativen Arbeiten bestrebt sein, den Nutzungsgrad der Schicht möglichst hoch zu halten. Dadurch spart man nicht nur Lösungsmittel, Schichtmaterial und Zeit, sondern, noch wichtiger, man erhält nach der Extraktion sogar reinere Komponenten.

Der einfachste Weg zur Erhöhung des Nutzungsgrades ist die diskontinuierliche "Mehrfachentwicklung". Die Vorzüge dieser Technik sind bereits von der analytischen Dünnschichtchromatographie bekannt und von ZOELLNER u. WOLFRAM [5], THOMA [6], STARKA und HAMPL [7] beschrieben. Wenig später wurde diese Technik auch bei der präparativen Schichtchromatographie von HALPAAP [8,9] verwendet.

Bei der Mehrfachentwicklung wird die Sorptionsschicht 2-4 mal mit dem gleichen Fließmittel chromatographiert. Zwischen zwei Entwicklungen wird die Schicht schonend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Substanzzonen werden immer schmaler, weil beim mehrmaligen Chromatographieren die Fließmittelfront den unteren Rand einer Zone bereits zu einem Zeitpunkt transportiert, an dem sie den oberen Rand noch nicht erreicht hat. Das Fließmittel muss bei dieser Technik weniger polar gewählt werden, sonst würden die Zonen gegen den oberen Rand der Platte wieder zusammen laufen. Folgendes Beispiel veranschaulicht die Ueberlegenheit dieser Technik: Ein Substanzgemisch, bestehend aus 3 etwa gleich starken unbekannten Komponenten, wurde auf 1 mm Kieselgel PF 254-Schicht chromatographiert. Das Verhältnis Substanz/Sorptionsmittel war 1:200. Die direkte Verwendung des analytischen Fließmittels Methylenchlorid-Essigester (50+50) hatte wenig Erfolg, weil 2 Komponenten ungetrennt blieben. Erst die dreimalige Entwicklung mit dem weniger polaren Fließmittel (Methylenchlorid mit nur 5 % Essigester-Zusatz) führte zur Trennung aller drei Zonen.

Fig. 3

Einfachentwicklung mit dem
Fliessmittel Methylenchlorid-
Essigester (50+50)
(2 Komponenten sind ungetrennt)

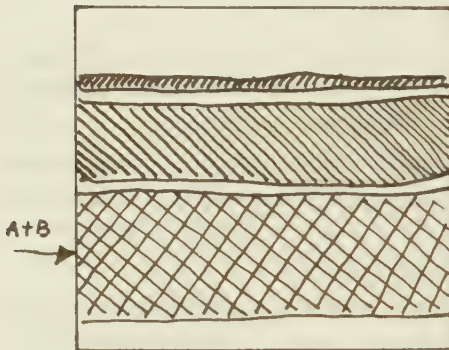
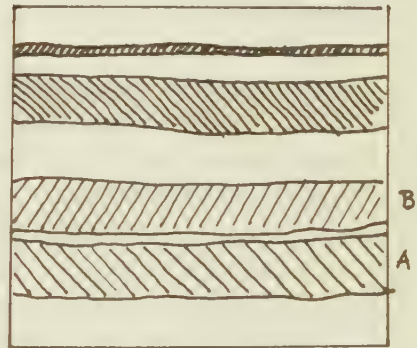


Fig. 4

Mehrfachentwicklung mit dem
Fliessmittel Methylenchlorid-
Essigester (95+5)
(alle 3 Komponenten trennen)



Die Mehrfachentwicklung hat aber auch gewisse Nachteile:

- a) die Trennung dauert länger als bei einer Einfachentwicklung
- b) sauerstoffempfindliche Substanzen können bei der Zwischentrocknung oxidieren.

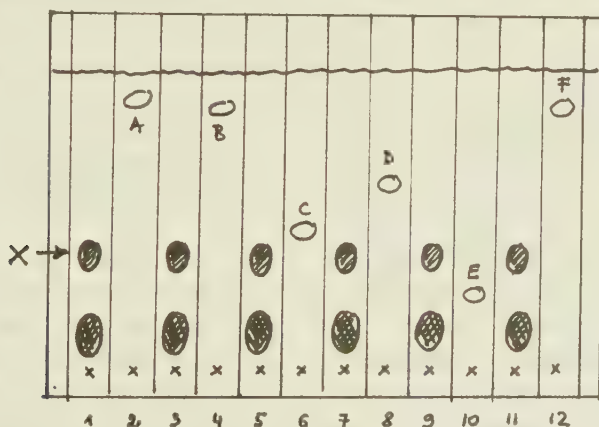
Lokalisierung der Zonen

Die getrennten Zonen müssen auf der Schicht zerstörungsfrei lokalisiert werden. Eigenfärbung und/oder Fluoreszenz im UV-Licht zeigen nur relativ wenig Substanzen. Ein grosser Teil der organischen Verbindungen hingegen ist UV-absorbierend und dank dieser Eigenschaft leicht nachweisbar. Man verwendet Schichten, denen gemäss Empfehlung von KIRCHNER [10] anorganische Fluoreszenz-Indikatoren zugesetzt werden. Durch Anregung mit kurzwelligem UV-Licht (254 nm) fluoresziert die Schicht und die UV-absorbierenden Substanzen treten als dunkle Zonen hervor.

Schwieriger ist die Lokalisierung farbloser und im UV-Licht nicht erkennbarer Substanzen. Falls die Zonen des präparativen Dünnschichtchromatogramms ziemlich gerade sind und der Abstand zwischen den Zonen genügend gross ist, kann man einfach die Ränder der Platte durch Besprühen mit einem adäquaten Reagens nachweisen. Da aber die Zonen öfters unregelmässige Formen haben, verwendeten wir eine neue Technik. Wir fügten dem zu trennenden Gemisch kleine Mengen ($< 1\%$) einer im UV-Licht erkennbaren Leitsubstanz zu, welche dann den genauen Verlauf der Zone verriet. Diese Technik wird am besten mit einem konkreten Beispiel beschrieben. Es handelt sich um die Isolierung einer aliphatischen Verbindung, die sonst nur durch Besprühen mit aggressiven Sprühreagenzien (z.B. konz. Schwefelsäure) und Erhitzen sichtbar wurde.

Fig. 5

Auswahl der Leitsubstanz



Das zu trennende Gemisch wurde auf mit ungeraden Zahlen nummerierten Bahnen chromatographiert. Die zu isolierende Zone ist mit X bezeichnet. Auf die geraden Bahnen wurden die möglichen Leitsubstanzen A-F chromatographiert. Sie sind im UV 254 erkennbar. Die Leitsubstanz "C" erfüllt die Anforderungen, sie wandert knapp oberhalb der zu isolierenden Zone.

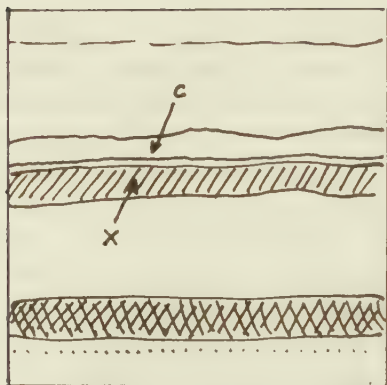


Fig. 6

Kontrolle der Trennung auf präparativer Schicht

Trennung zwischen Leitsubstanz C und Zone X ist gut. Die präparative Arbeit kann beginnen.

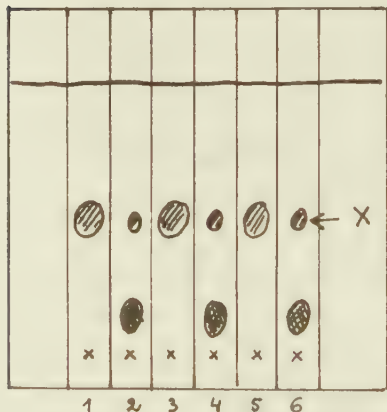


Fig. 7

Kontrolle der isolierten Substanz

Die unbekannte Verbindung konnte dank der Leitsubstanz sauber isoliert werden.

- 1, 3, 5: isolierte Substanz "X"
2, 4, 6: Ausgangssubstanz.

Desorption der getrennten Komponenten

Die chromatographischen Sorptionsmittel besitzen grosse spezifische Oberflächen, sodass die darauf befindlichen Zonen den Zersetzungseinflüssen von Luft, Licht und Chemikaliendämpfen besonders ausgesetzt sind. Die chromatographierten Platten trocknet man vorsichtshalber wenige Minuten bei Raumtemperatur und schabt dann die markierten Zonen mit einem Spatel ab. Bei empfindlichen Substanzen ist es vorteilhaft, die Zonen aus gerade noch feuchten Platten zu entfernen. Das Schichtmaterial wird in einem Kolben gesammelt und sofort mit einem leichtflüchtigen Lösungsmittel geeigneter

Polarität überdeckt. Als Faustregel gilt, dass man das Extraktionsmittel möglichst apolar wählt, denn die Sorptionsmittel enthalten immer unerwünschte Fremdstoffen und diese werden desto besser extrahiert, je grösser die Polarität des Extraktionsmittels ist. Kieselgel PF 254 Merck enthält z.B. neben geringen Mengen feinkörnigem Siliciumdioxid auch ein organisches Bindemittel unbekannter Struktur, welches den dickeren Schichten die notwendige mechanische Resistenz verleiht. Während der extrahierbare Anteil des Kieselgel PF 254 mit Chloroform nur 0,01 % beträgt, ist dieser mit Methanol bereits ca. 0,1 %.

Pro 1 g Schichtmaterial verwendet man durchschnittlich 6 ml Lösungsmittel und extrahiert 5-30 min bei Raumtemperatur. Eine höhere Temperatur ist wegen der Empfindlichkeit zahlreicher Verbindungen nicht zu empfehlen.

Die Suspension wird anschliessend durch einen G4-Glasfilter abgesaugt. Die letzten Sorptionsmittelreste aus dem Filtrat können durch nochmalige Filtration, und zwar durch feinporige G5-Glasfilter, entfernt werden.

Das klare Filtrat wird dann im Vakuum-Rotationsverdampfer bei mässiger, möglichst niedriger Temperatur eingedampft. Es ist bereits öfters vorgekommen, dass eine Verbindung sich bei 50°C zersetzt und bei Wiederholung der Arbeit bei 30°C unzersetzt isoliert werden konnte.

Falls möglich, sollte man jede durch präparative Schichtchromatographie isolierte Komponente einmal umkristallisieren oder destillieren, um die oben erwähnten, aus dem Schichtmaterial stammenden fremden Verunreinigungen zu entfernen. Diese Empfehlung ist bei geringen Substanzmengen schwer durchführbar. Im Laufe unserer Arbeiten hat es sich gezeigt, dass bei der Verwendung von frisch destillierten Lösungsmitteln von geringer bis mittlerer Polarität (z.B. Cyclohexan, Methylenchlorid, Chloroform, Essigester) die extrahierten Substanzen genügend sauber waren für die spektroskopische Analyse. Falls man gezwungen war, polarere Lösungsmittel zu verwenden (z.B. Aceton, Äthanol, Methanol), war die Reinheit der Substanzen nicht ausreichend. Anstelle der Umkristallisation genügte entweder eine Umlösung mit weniger polaren Lösungsmitteln oder eine Reinigung durch Gelfiltration an

Sephadex LH-20. Die Reinigung durch Umlösen der getrennten Komponenten in einem weniger polaren Lösungsmittel basiert auf der schlechten Löslichkeit der unerwünschten artfremden Verunreinigungen.

Beispiel:

Auf zwei 20x100 cm Platten, beschichtet mit 1 mm Kieselgel PF 254, wurde je 100 mg reines Coffein chromatographiert. Die Coffein-Zonen wurden mit Methanol extrahiert, filtriert, eingedampft und im Hochvakuum getrocknet. Zur Beurteilung des wiedergewonnenen Coffeins wurde die Mikroelementaranalyse und die Infrarotspektroskopie beigezogen. Das im weniger polaren Lösungsmittel (Chloroform) umgelöste Coffein war sauber, während die nicht umgelöste Probe 10 % weniger C und ein schlechteres IR-Spektrum zeigte. Die Analysendaten sind auf Tabelle 6 ersichtlich.

Tab. 6

Analyse des Coffeins, welches vorher auf Kieselgelschicht chromatographiert wurde

Probe	% C		% H		IR-Spektrum
	gef	ber	gef	ber	
Nr. 1 = Methanol-Extrakt t.q.	39,27	49,48	4,72	5,18	schlecht
Nr. 2 = Methanol-Extrakt eingedampft und mit Chloroform umgelöst	49,78	49,48	5,27	5,18	in Ordnung

Zur Reinigung mittels Gelfiltration verwendeten wir mit Sephadex LH-20 gefüllte Säulen. Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala) besteht aus einem zweidimensionalen Netzwerk von Polysaccharidketten (Dextran Quervernetzt mit Epichlorhydrin). Im LH-20 Typus wurde der grösste Teil der Hydroxyl-Gruppen alkyliert und dadurch ist dieses Produkt sowohl in Wasser wie in den meisten organischen Lösungsmitteln quellbar. Sephadex wirkt als ein Molekularsieb und der Typus LH-20 eignet sich für den Molekulargewichtsbereich 100 bis 4000. Das Elutionsmittel passten wir der Polarität der Substanzen an und verwendeten meistens Chloroform, Aethanol oder Gemische

dieser beiden Lösungsmittel. Die gesuchte Fraktion fanden wir wieder mittels dünn-schichtchromatographischer Prüfung der Fraktionen. Eine solche Reinigung beansprucht zwar einen halben Arbeitstag, führt dann aber zu reinen Präparaten.

Zur Isolierung mengenmässig schwacher Komponenten braucht man relativ viele präparative Platten. Dadurch wird das Verhältnis Substanz/Schichtmaterial kleiner und die Extrakte sind stark verunreinigt. Es lohnt sich deshalb, den ersten Extrakt auf nur eine Platte zu re-chromatographieren, um dadurch eine starke Zone zu erhalten. Das Verhältnis Substanz/Sorptionsmittel im neuen Extrakt wird günstiger sein.

3.2.2 Praktisches Beispiel an Hand eines konkreten Problems

(Aufklärung einer Rheinwasserverschmutzung)

Problemstellung

Beim Kraftwerk Birsfelden wurden im Rhein im Jahre 1971 gelbe Schwebestoffe beobachtet. Es handelte sich offensichtlich um eine von der anliegenden Industrie verursachte Rheinverschmutzung. In Zusammenarbeit mit den Behörden gelang es der Analytik der Fa. CIBA-GEIGY, die chemische Zusammensetzung der Rheinverschmutzung auf analytischem Wege zu bestimmen. Das Problem wurde mittels Chromatographie und Spektroskopie gelöst. Die Verunreinigung stammte aus der Produktion von CIBA-GEIGY AG.

Experimentelles Vorgehen

Aus 43 g Wasserprobe erhielten wir nach schonendem Eindampfen am Vakuumrotationsverdampfer 2,9 g = 7 % festen Rückstand. Dieser Rückstand war in Chloroform praktisch vollständig löslich. Bei der DC-Untersuchung (System = Kieselgel G/Benzol-n-Hexan = 50+50) wurden über 10 Zonen beobachtet, wovon die 5 stärksten auf 1 mm dicken Kieselgel-Schichten in Milligramm-Mengen isoliert wurden. Hierbei wurde das gleiche Fließmittel verwendet.

Folgende Photos zeigen die Trennung auf präparativen bzw. analytischen DC-Platten:

Fig. 8

Präparative Trennung



Fig. 9

Analytische Kontrolle
der isolierten Zonen

1	2	3	4	5	1
○	○	○	○	○	○
○			○		○
○				○	○
○					○
⊗	x	x	x	x	⊗

Legende zu Fig. 9

1. Chloroformlöslicher Rückstand aus Rheinwasserprobe
2. Präparat Sz 665 (farblos)
3. Präparat Sz 666 (gelb)
4. Präparat Sz 668 (gelb)
5. Präparat Sz 667 (violett)

Aus der präparativen Trennung berechneten wir folgende grobe Materialbilanz:

Eingesetzte Menge an chloroformlöslichem festem Rückstand = 500 mg.

Isolierte Mengen:

Zone 665 = 105 mg (21 %)

Zone 666 = 55 mg (11 %)

Zone 668 = 15 mg (3 %)

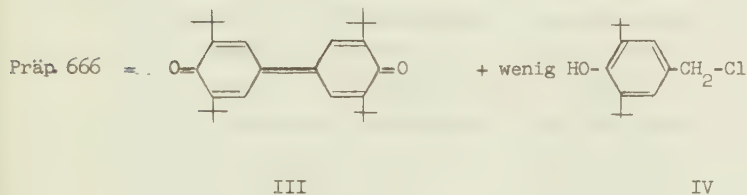
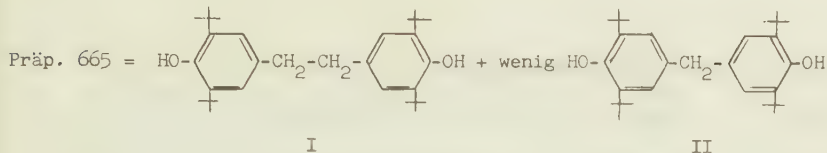
Zone 667 = 10 mg (2 %)

Zone 670 = 100 mg (20 %)

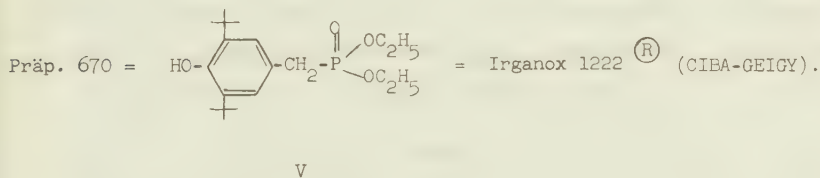
Total: 285 mg (57 %)

Der Materialverlust von ca. 40 % ist bei derartigen Isolierungen normal.

Die chromatographisch isolierten Präparate wurden von ALT und RICHTER [11] untersucht und folgende Strukturen wurden ermittelt:



Präp. 667 = Kein Strukturvorschlag



Die Strukturen I, III und V sind durch die qualitative Identität der Spektren mit denen von authentischen Vergleichsmustern bewiesen. Aus dem IR-Spektrum des Trockenrückstandes ergibt sich, dass die Verbindungen I und V Hauptbestandteile sind.

Charakteristische spektroskopische Daten:

- Präp. 665 IR-Sp.: Banden bei 2.78 μ (OH), 6.30 μ (Aryl), 7.35 μ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)
 NMR-Sp.: Signale bei $\tau = 3.05$ (Aryl), 7.2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 8.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)
 Kleiner Anteil an II: Signale bei $\tau = 3.0$ und 6.2
 Massen-Sp.: Molekülion-Peaks bei m/e 438 (I) und 424 (II);
 Hauptfragment bei m/e 219 (Ar-CH_2^+).
- Präp. 666 IR-Sp.: Banden bei 6.1/6.25/6.4 μ (C=O + ungesätt. H),
 7.35 μ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)
 NMR-Sp.: Signale bei $\tau = 2.3$ ($=\text{C-H}$), 8.65 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)
 Massen-Sp.: Molekülion-Peaks bei m/e 408 (III) und daneben mit
 schwacher Intensität m/e 254/256 (IV).
- Präp. 667 IR-Sp.: Banden bei 3.4, 5.8, 6.2, 6.3, 6.4, 6.6, 8.1 μ
 NMR-Sp.: Signale bei $\tau = 8.4 - 9.2$
 Massen-Sp.: Vermutlicher Molekülion-Peak bei m/e 504.
- Präp. 668 IR-Sp.: Banden bei 2.76 μ (OH), 6.0/6.1 μ , 7.32 μ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$)
 NMR-Sp.: Signale bei $\tau = 2.95$, 3.35, 4.95, 6.25, 6.5, 8.6, 8.8, 8.85
 Massen-Sp.: Vermutlicher Molekülion-Peak bei m/e 468.
- Präp. 670 IR-Sp.: Banden bei 2.95 μ (OH), 7.37 μ ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 7.95 μ
 (P=O), 9.75/10.3 μ (P-O-C)
 NMR-Sp.: Signale bei $\tau = 2.95$ (Aryl), 6.0 (PO-CH_2), 7.0
 (P-CH_2), 8.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 8.8 (CH_3)
 Massen-Sp.: Molekülion-Peak bei m/e 356; Hauptfragmente bei m/e 341
 (M-CH_3 , m/e 219 (Ar-CH_2^+)).

3.3. Identifizierung durch Mikrotransfer DC-IR

3.3.1 Einleitung

STAHL [12] hat die kombinierte Anwendung der Dünnschichtchromatographie mit verschiedenen physikalischen, chemischen und biologischen Verfahren beschrieben und die Begriffe "Kopplung" und "Transfer" präzisiert. Nach seiner Definition ist die Kopplung eine direkte Kombination zweier Methoden ohne manuelles Eingreifen, während der Transfer manuelles Eingreifen benötigt. Unter Mikrotransfer DC-IR verstehen wir die Kombination der Dünnschichtchromatographie und der Infrarotspektroskopie im Mikrogramm-Bereich. Der Zweck des Mikrotransfers ist die Strukturaufklärung oder Strukturbestätigung von Komponenten. Die Substanzgemische werden auf konventionellen, 0.25 mm dünnen Schichten getrennt. Je nach Transfer- bzw. Aufnahme-Technik benötigt man pro Komponente 10 - 200 µg Substanzmenge. Im Falle von Hauptkomponenten kann eine punktförmige Auftragung des Stoffgemisches genügend Substanzmenge liefern. Bei Nebenkompontenten hingegen muss man das Substanzgemisch entweder mehrmals nebeneinander auftragen oder, noch besser, die strichförmige Auftragung wählen.

Der Hauptvorteil des Mikrotransfers gegenüber der herkömmlichen präparativen Schichtchromatographie besteht in seinem geringen Bedarf an Substanzmengen, was die Untersuchung von kostbaren, nur in beschränkten Mengen vorhandenen Substanzgemischen ermöglicht. Ausserdem ist der Arbeitsaufwand geringer als bei der präparativen Schichtchromatographie, da für die eigentliche Trennung nur wenige, oft sogar nur 1 - 2 DC-Platten benötigt werden.

3.3.2 Uebersicht der bisher bekannten Methoden

CERNY et al. [13], FONTANGES et al. [14], McCOY et al. [15], NASH et al. [16], SNAVELY et al. [17] beschreiben die Extraktion von kleinen Substanzmengen aus dem DC-Schichtmaterial, wobei das Sorptionsmittel durch Filtrieren und/oder Zentrifugieren entfernt wird. Die zur Trockene eingedampften Extrakte werden wieder gelöst und zur

Herstellung eines Kaliumbromid-Presslings verwendet. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Extrakte nach der einfachen Reinigungsprozedur Rückstände von Sorptionsmittel enthalten. Im Falle von Kieselgel-Schichten enthalten die auf diese Weise erhaltenen IR-Spektren ziemlich starke Signale bei ca. $9\ \mu$. BEYERMANN und ROEDER [18] haben anstelle eines KBr-Presslings den DC-Extrakt auf einen polierten Stahlspiegel von 2 - 4 mm Durchmesser getropft und darauf eingedampft.

Erst die nachfolgenden Autoren haben der Reinigung der Extrakte größere Aufmerksamkeit geschenkt.

GARNER und PACKER [19] haben ein aus KBr vorgepresstes, saugfähiges 25 mm hohes Prisma verwendet. Dieses ist unter der Bezeichnung "Wick-Stick T.M." kommerziell erhältlich (Hersteller: Harshaw Chemical Co., Cleveland, Ohio). Das Prisma wird in ein Gläschen gestellt. Das Sorptionsmittel, welches die Substanz enthält, wird mittels eines Trichterchens auf den Boden des Gläschens geschüttet. Dann wird die Substanz durch Zugabe von wenig Lösungsmittel aus dem Schichtmaterial extrahiert. Die Lösung steigt im porösen KBr durch Kapillarkräfte hoch, und das Lösungsmittel verdunstet. Die Substanz wird nach oben transportiert und durch wiederholte Lösungsmittelzugabe an der Spitze des Prismas angereichert. Die Spitze (10 - 20 mg) wird abgebrochen, getrocknet und zur Herstellung eines Mikro-KBr-Presslings verwendet. Diese Methode liefert saubere, untergrundfreie Spektren, weil das Sorptionsmittel in der KBr-Matrix zurückgehalten wird.

Auch RICE [20] hat den Filtrationseffekt von KBr ausgenutzt, aber er führt den Mikrotransfer direkt auf der DC-Platte aus. Der zerstörungsfrei lokalisierte DC-Fleck wird mit einem Stift umrandet. Die DC-Schicht wird ausserhalb der markierten Fläche entfernt, und ca. 30 mg KBr-Pulver werden auf die Glasplatte gegeben, wodurch ein ca. 8 mm langer Hügel entsteht. Dieser Hügel muss mit dem DC-Fleck Kontakt haben. Dann spült man die Substanz mit einem geeigneten Lösungsmittel vom Sorptionsmittel möglichst weit in die KBr-Hügel hinüber.

Die erste Hälfte des Hügels ist mit Sorptionsmittel verunreinigt und wird weggeworfen. Die zweite Hälfte, welche den Hauptanteil der Substanz enthält, ist praktisch frei von Sorptionsmittel und wird zur Herstellung des Mikropresslings verwendet. De KLEIN [21] hat die Methode von RICE modifiziert. Er erreicht grössere Substanz-Ausbeuten, aber auf Kosten der Reinheit.

3.3.3 Eigene Erfahrungen mit den erwähnten DC-IR Mikrotransfer-Methoden sowie einige Verbesserungsvorschläge

Wir haben zuerst die vorher erwähnten Methoden getestet, indem wir bekannte Vergleichssubstanzen auf Kieselgelschicht chromatographierten und dann nach den verschiedenen Vorschriften wieder isolierten bzw. jeweils zu einem KBr-Pressling aufarbeiteten. Als Vergleichssubstanz verwendeten wir 2-Naphtol und Coffein und als Schichtmaterial Kieselgel G Merck. Die einfachen Extraktionsmethoden [13 - 17] haben IR-Spektren mit Störbanden bei ca. $9\ \mu$ ergeben, weil das Schichtmaterial (Kieselgel) nicht vollständig entfernt werden konnte. Diejenigen Methoden hingegen, welche sich den Filtrationseffekt des KBr zu Nutzen machten [19, 20], lieferten in der Regel saubere Spektren, auch im Falle von wenig Substanz ($10\ \mu\text{g}$ Coffein oder 2-Naphtol pro DC-Fleck).

Nachdem die verschiedensten DC-IR Mikrotransfer-Methoden mit bekannten Vergleichssubstanzen getestet wurden, haben wir sie zur Lösung konkreter Probleme verwendet. Während dieser Arbeiten bewährte sich die Wick-Stick-Methode von GARNER und PACKER [19] am besten. Allerdings wurden gegenüber der ursprünglichen Arbeitsweise einige Verbesserungen eingeführt:

a. Extraktion in separatem Gläschen

Die ausgekratzte chromatographische Zone wird nicht im Wick-Stick-Gläschen, sondern in einem separaten Reagensgläschen (Φ = ca. 8 mm) extrahiert. Je nach Grösse des DC-Flecks gibt man zuerst eine Portion von 100 - 300 μl Lösungsmittel zu, schüttelt das Reagensgläschen und danach lässt man die Suspension dekantieren. Nach 2 - 3 min zieht man

die klare Lösung mit einer 100- μ l-Mikrospritze auf (evtl. in 2 Portionen) und überträgt sie auf den Boden des Wick-Stick-Gläschens. Die darauffolgenden 3 - 4 Lösungsmittelzugaben sind nur halb so gross wie die erste Zugabe und werden direkt ins Wick-Stick-Gläschen eingeführt. Als Lösungsmittel verwendeten wir meistens Methylenchlorid, Chloroform, Essigester, Aceton, Aethanol oder Methanol.

b. Auswahl des Lösungsmittels in einfachen Vorversuchen

Es lohnt sich, das zur Transferierung verwendete Lösungsmittel in Vorversuchen auszuwählen. Dazu braucht man nicht die ganze Wick-Stick-Operation auszuführen, sondern es genügt ein einfacher DC-DC-Nasstransfer. Dieser gibt Auskunft über die Extraktionsausbeute der Komponente aus dem Schichtmaterial, indem man Grösse und Intensität des nasstransferierten Flecks grob schätzen kann. Ausserdem signalisiert der Nass-transfer eine eventuelle Zersetzung der Probe, da nebst dem gewünschten DC-Fleck weitere Flecken entstehen.

c. Handhabung geringer Proben

Mittels farbiger und UV-fluoreszierender Vergleichssubstanzen stellten wir fest, dass trotz drei- bis viermaligem Nachwaschen des KBr-Prismas noch immer ein Teil der Komponente auf dem Boden des Wick-Stick-Gläschens zurückblieb und damit verloren ging. Darum lohnt es sich, vor allem, wenn wenig Substanz zur Verfügung steht (z.B. $< 20 \mu\text{g}$ pro Komponente), solche "Boden-Reste" zu vermeiden, indem man den Extrakt nicht wie gewohnt im Wick-Stick-Gläschen, sondern direkt auf das KBr-Prisma aufträgt. Gute Ausbeuten erhielten wir bei der Auftragung des Extraktes auf halber Höhe des KBr-Prismas in kleinen Portionen von je ca. 5 μ l.

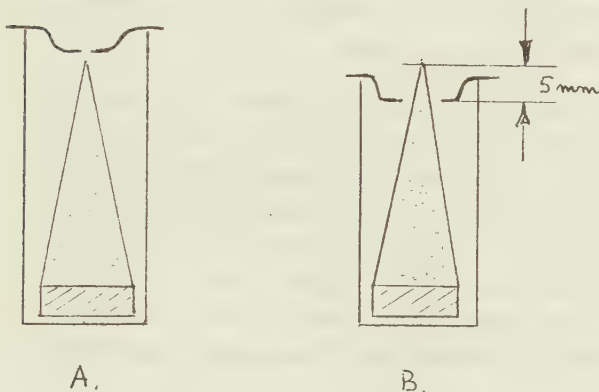
d. Modifikation des Wick-Stick-Gläschens zwecks Beschleunigung der Verdampfung

Die Gesamtmenge von 0.25 - 1 ml Lösungsmittel braucht durchschnittlich 2 - 3 Std. Zeit, um ins KBr-Prisma zu steigen und dort zu verdampfen. Diese Zeit lässt sich um die Hälfte reduzieren, wenn man die Spitze des KBr-Prismas einige Millimeter über der Deckelöffnung herausragen lässt. Damit wird eine schnellere Verdampfung des Lösungsmittels be-

wirkt. SPITZER [22] hat die Höhe des Glaszylinders auf 22 mm verkürzt und die zentrale Öffnung des Deckels auf 4 mm ϕ vergrößert.

Fig. 10

Schematische Darstellung der Wick-Stick-Anordnung



A. Ursprüngliche Version nach GARNER und PACKER [19]

B. Modifiziert von SPITZER [22]

Mit einem leichten Unterdruck kann man die Verdampfung des Lösungsmittels noch mehr beschleunigen. Noch besser ist es jedoch, wenn man auf die herausragende KBr-Spritze einen schwachen Stickstoff-Strom leitet.

3.3.4 Herstellung der Mikro-KBr-Presslinge und Aufnahme der IR-Spektren

Die Herstellung der KBr-Presslinge und die Aufnahme der IR-Spektren wurde in der Abt. Spektroskopie der Ciba-Geigy Basel von Herrn K.O. Alt und Mitarbeitern ausgeführt. Dort hat man anstelle eines heiklen Mikro-Presswerkzeuges eine normale Presse für 13 mm ϕ Pillen verwendet. In diese hat man eine Kartonreduzierscheibe von 0,8 mm

Dicke und 1 x 5 mm Ausschnitt eingesetzt. Zur Probenvorbereitung wird das KBr (z.B. die Spitze eines Wick-Sticks) in einer Achat-schale pulverisiert, in das erwähnte Werkzeug eingefüllt und zu einer Mikrotablette verpresst. Der normale Druck, gleich wie für 13 mm Pillen, führte zu einwandfreien Mikropresslingen von 1 x 5 x 0,3 mm. Für diese Grösse braucht man genau 15 mg KBr. Es ist wichtig, diese Menge möglichst genau einzuhalten, um ein "Fliesen" über den Ausschnitt hinaus zu vermeiden.

Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte auf einem Spektrophotometer Modell 221 bzw. 157 der Fa. Perkin-Elmer. Als Zubehör wurde ein Linsen-Beamcondenser und ein Reference Beam Attenuator (AT 04) der Firma RIIC (= Research and Industrial Instrum. Corp.) eingesetzt. Die KBr-Tablette von 1 x 5 x 0,3 mm wird im Beamcondenser eingesetzt und im Strahlengang der Spektrographen auf maximale Energie justiert. Bei der anschliessenden Registrierung des Spektrums kann nötigenfalls mit Ordinatendehnung und Abschwächung des Referenzstrahles gearbeitet werden.

3.3.5 Praktische Beispiele mit dem DC-IR Mikrotransfer

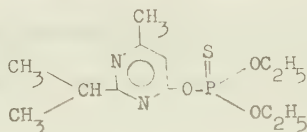
Der DC-IR-Mikrotransfer hat sich bei der Lösung konkreter analytischer Probleme sehr gut bewährt. Im Laufe der letzten 2 Jahre haben wir zahlreiche Komponenten getrennt und zur Mikro-IR-Aufnahme präpariert. Im folgenden sollen lediglich einige typische Beispiele erwähnt werden. Bei den Beispielen a) und b) handelt es sich um die Strukturbestätigung bereits vermuteter Verbindungen, während es sich bei Beispiel c) um eine Strukturaufklärung handelt.

Beispiel a)

Identifizierung von Spuren eines Insektizides in Wollfett-Extrakt

In einem Wollfett-Muster wurden gaschromatographisch Spuren von Diazinon^(R) Wirksubstanz ermittelt (ca. 10 ppm). Der Befund sollte mittels DC-IR Mikrotransfer bestätigt werden.

Strukturformel von Diazinon[®] Wirksubstanz:



Experimentelles:

- Trenntechnik: aufsteigend, auf 20 x 20 cm Platten
- Schicht: 0,25 mm Kieselgel GF 254, Merck, aktiviert bei 110 °C
- Fliessmittel: Essigester-Hexan (10+90)
- Aufgetragene Extraktmenge: Aliquot entsprechend 5 g Wollfett aus äthanolischer Lösung, auf eine 15 cm lange Startlinie
- Mikrotransfer: Die Zone bei Rf 0,40 wurde unter UV 254 markiert und mittels Wick-Stick-Technik für IR-Aufnahme präpariert
- Spektroskopischer Befund: Das IR-Spektrum der transferierten Substanz ist identisch mit demjenigen der authentischen Vergleichssubstanz (vergl. Fig.11 u.12).

Beispiel b)

Identifizierung eines Herbizides in Erde

Eine landwirtschaftliche Kultur ging aus unbekannten Gründen plötzlich zugrunde. Zwar vermutete man eine Verwechslung von Kunstdünger mit Herbizid-wirksamen Substanzen, aber man besaß keine handfesten Beweise. Unsere Aufgabe bestand darin, dieser Vermutung nachzugehen und in den Boden-Proben eventuell vorhandene Herbizid-wirksame Substanzen nachzuweisen.

20 g Erde wurden nach der Methode von DELLEY et al. [23] extrahiert und dünnschichtchromatographisch untersucht. Als Vergleichssubstanzen wurden 7 verschiedene authentische Triazin-Herbizide mitchromatographiert.

Fig. 11

IR-Spektrum der aus Wollextrakt isolierten und mittels Wick-Stick transferierten Substanz

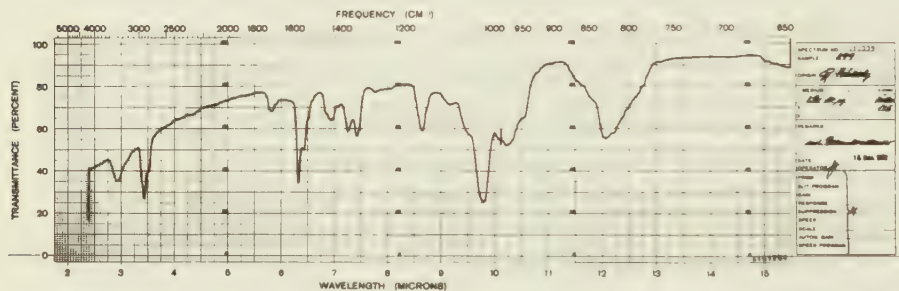
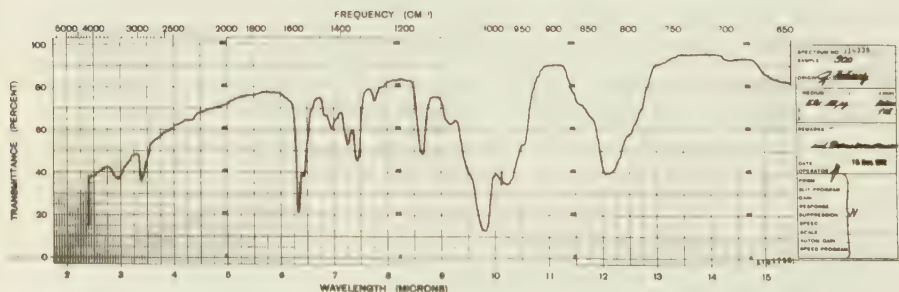


Fig. 12

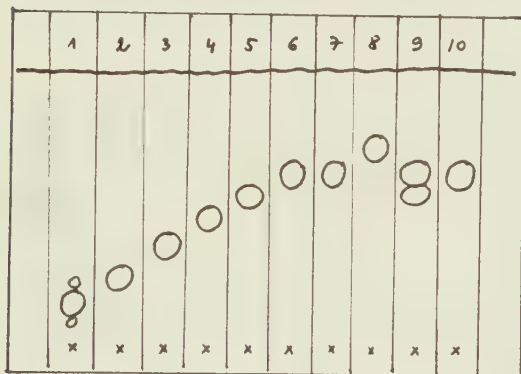
IR-Spektrum der authentischen Diazinon-Wirksubstanz



Für die Aufnahme der IR-Spektren danken wir Herrn K.O. Alt (Fa. CIBA-GEIGY AG., Basel).

Fig. 13

Dünnschichtchromatographische Untersuchung von Erde-Extrakt nebst 7 verschiedenen Triazin-Herbiziden nach der Methode von DELLEY et al. (23)



1. ATRATON ^(R) 2-Aethylamino-4-isopropylamino-6-methoxy-s-triazin
2. PROMETON ^(R) 2,4-bis(Isopropylamino)-6-methoxy-s-triazin
3. SIMAZIN ^(R) 2,4-bis(Aethylamino)-6-chlor-s-triazin
4. ATRAZIN ^(R) 2-Aethylamino-4-chlor-6-isopropylamino-s-triazin
5. PROPACIN ^(R) 2-Chlor-4,6-bis(isopropylamino)-s-triazin
6. PROMETRYN ^(R) 2,4-bis(Isopropylamino)-6-methylthio-s-triazin
7. EXTRAKT ^(R) entsprechend 0,5 g Erdeprobe
8. TRIETAZIN ^(R) 2-Aethylamino-4-chlor-6-diaethylamino-s-triazin
9. Gemisch Bahn 7 + 5
10. Gemisch Bahn 7 + 6

Diese dünn-schichtchromatographische Untersuchung zeigte Rf-Gleichheit der unbekannten Verbindung aus der Erde mit Prometryn Wirksubstanz. Da aber gleiche Rf-Werte noch lange nicht gleiche chemische Strukturen bedeuten, haben wir die unbekannte Verbindung mittels Wick-Stick-Technik für eine IR-Aufnahme präpariert. Erst die Identität der IR-Spektren (Nr. 514306 und Nr. 505206) haben den sicheren Beweis geliefert. Beide Spektren enthalten charakteristische Banden bei 3.08, 3.38, 6.24, 6.63 und 12.37 μ (vergl. Fig. 14 und 15).

Fig. 14

IR-Spektrum der aus Erde-Extrakt isolierten und mittels Wick-Stick transferierten Substanz

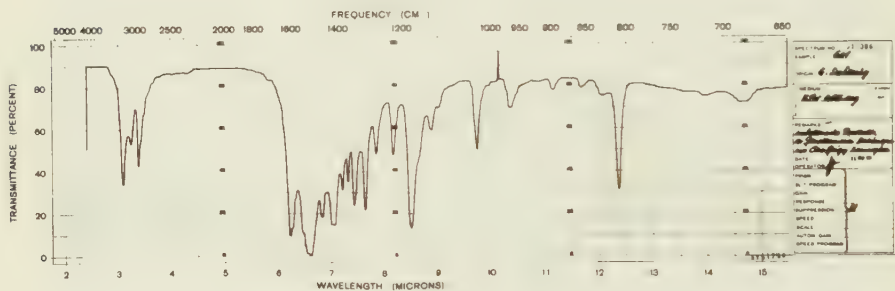
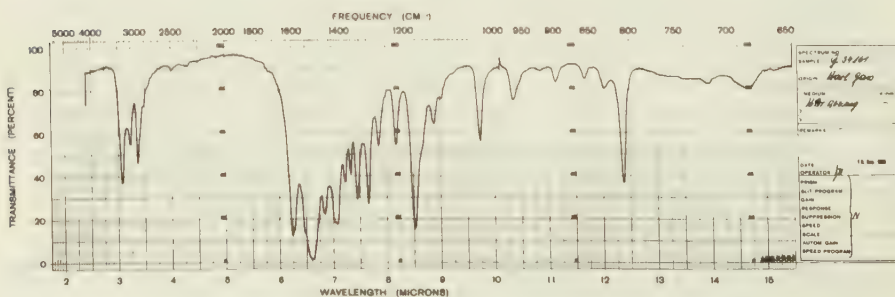


Fig. 15

IR-Spektrum der authentischen PROMETHYN - Wirksubstanz



Für die Aufnahme der IR-Spektren danken wir Herrn K.O. Alt (Fa. CIBA-GEIGY AG., Basel).

Beispiel c)

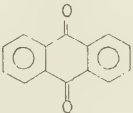
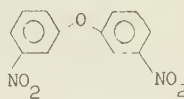
Identifizierung von unbekannten NebenkompONENTEN
in technischem m-Nitrophenol

Technisches m-Nitrotoluol enthält einen geringen unbekannten, was-serunlöslichen Anteil bei pH 10.0. Dieser Anteil wurde durch Fil-tration getrennt und sollte chromatographisch untersucht werden.

In DC-System Kieselgel GF₂₅₄ Merck/Benzol zeigt der Filter-Rückstand ein Gemisch von 5 Komponenten. Die einzelnen Komponenten wurden mit-tels DC-IR-Mikrotransfer (Wick-Stick-Technik) untersucht und ALT [247 konnte genaue Strukturvorschläge für 3 Verbindungen ermitteln.

Tab. 7

Zusammenfassung der chromatographischen und spektroskopischen Ergebnisse

Rf-Wert	%-Anteil (grobe Schätzung)	IR-Sp. Nr.	IR-Banden (μ)	Struktur- vorschlag
0.15	~ 1 %	402070	2.95, 6.18/6.3, 6.73, 6.52, 7.38, 11.4, 12.3, 13.5, 14.9	
0.43	~ 1 %	402068	6.05, 6.23/6.3, 6.5, 11.8, 12.8/13.2, 14.4	-
0.57	~ 4 %	402067	5.96, 6.28/6.31 12.4, 14.5	
0.64	~ 2 %	402071		-
0.80	~ 90 %	402069	6.2/6.73, 6.5/7.38, 8.05, 12.1/12.3/12.5, 13.5	

3.4. Identifizierung durch Mikrotransfer DC-MS

3.4.1 Einleitung

Unter Mikrotransfer DC-MS verstehen wir die Kombination der Dünnschichtchromatographie und Massenspektroskopie im Mikrogramm-Bereich. Das Stoffgemisch wird auf einer konventionellen, 0,25 mm dünnen Schicht getrennt und die einzelnen Flecken bzw. Zonen werden aus der Schicht entfernt und in das Massenspektrometer überführt.

Die auf diese Weise erhaltenen Massenspektren müssen mit den Spektren der direkt aufgenommenen reinen Substanzen vergleichbar sein und dienen zur Strukturaufklärung von Komponenten.

3.4.2 Übersicht der bisher bekannten Methoden

FETIZON /25/ hat das Stoffgemisch auf mehreren analytischen DC-Platten getrennt (20 x 20 cm, mit 0.25 mm Schichtdicke) und die einzelnen Komponenten in Milligramm-Mengen isoliert. Die Umkristallisation der Komponenten ist für die darauffolgende MS-Untersuchung von Vorteil. Diese Methode funktioniert gut, falls genügend Substanzgemisch vorhanden ist. In der Praxis kommt es jedoch öfters vor, dass Strukturaufklärungen mit geringeren Mengen ausgeführt werden müssen.

HEYNS und GRUETZMACHER /26/, McFADDEN /27/, ZEMAN und WIROTAMA /28/ sind den einfachsten Weg gegangen, indem sie das Schichtmaterial zusammen mit der darauf adsorbierten Substanz direkt in den Massenspektrographen einbrachten. Die Resultate waren jedoch unbefriedigend, weil das aktive Kieselgel zur Zersetzung der Proben führte. SPITTELER /29/ hat darauf hingewiesen, dass diese Technik unüberwindliche Schwierigkeiten bereitet. Der Massenspektrograph wird mit Sorptionsmittelsaub verschmutzt und es muss mit mehrtägigem Ausfall des Gerätes gerechnet werden. Ausserdem ist der Untergrund hoch und die Entgasung des Schichtmaterials nicht möglich.

SCHWARTZ, BOMER und VANE /30/, SCHWARTZ, VANE, POSTMA /31/ haben die Substanzen aus dem Schichtmaterial (Kieselgel) mit wenig Lösungsmittel

extrahiert, den Extrakt eingeengt und aliquote Teile des Konzentrats mit 1 - 5 µg Substanz zur Aufnahme der Spektren verwendet. Auf diese Weise erhaltene Spektren haben einen starken Untergrund, und die von der Substanz stammenden Signale sind kaum zu erkennen. Die Methode ist nur für die Untersuchung leicht erkennbarer, z.B. chlorhaltiger Verbindungen geeignet.

KAISER [32] hat die DC-Trennung auf Quarzplatten ausgeführt und die Flecken von der Plattenrückseite mit einer kleinen Sauerstoff-Wasserstoff-Flamme erhitzt. Die Substanz wird dabei verdampft und gelangt mit Hilfe eines inerten Trägergases in einen Massenspektrographen. Voraussetzung ist dabei, dass die zu untersuchende Substanz unzer setzt verdampfbar ist. Dies ist aber nicht immer der Fall, da sich bekanntlich zahlreiche organische Substanzen unter Hitze-Einwirkung zersetzen, besonders wenn sie sich in adsorbiertem Zustand befinden. KAISER empfiehlt für solche Fälle die Verwendung von weniger aktivem Schichtmaterial, aber er weist gleichzeitig darauf hin, dass dann die Trennung erschwert oder gar verunmöglicht wird.

3.4.3 Neu entwickelte DC-MS Mikrotransfer-Methoden

Die vorher erwähnten Methoden haben uns entweder nicht befriedigt oder wir konnten sie gar nicht nacharbeiten (z.B. die Methode von KAISER). Deshalb stellten wir uns als Zielsetzung, neue, einfache Methoden zu entwickeln, welche folgenden Anforderungen entsprechen sollen:

- a. mit wenigen Mikrogramm Substanz gute, untergrundfreie Spektren zu geben,
- b. den Massenspektrographen nicht auf längere Zeit zu blockieren.

Unsere Zielsetzung von wenigen µg Substanz ist damit begründet, dass Mengen von 1 - 10 µg Substanz pro DC-Fleck relativ einfach erreichbar sind, auch auf 0.25 mm konventionellen DC-Schichten. Da die Empfindlichkeit der Massenspektrometrie im Bereich von ng/sec liegt, ist

die oben angestrebte Empfindlichkeit realistisch. Wie wir im Laufe der praktischen Arbeiten allerdings feststellten, liegt die grosse Schwierigkeit nicht in der Menge der Proben, sondern in deren Reinheit.

Wenn man überlegt, dass einige wenige Mikrogramm Substanz aus der vielfachen Menge Sorptionsmittel entfernt werden müssen, und zwar mittels einer vielfachen Menge Lösungsmittel, realisiert man die Gefahr, diese sehr kleine Substanzmenge mit allerlei Verunreinigungen zu kontaminieren. Es kann leicht vorkommen, dass man neben der gewünschten Komponente die vielfache Menge Verunreinigung erhält. Um das zu vermeiden, soll man folgendes berücksichtigen:

- Das Verhältnis der zu isolierenden Substanz zum Sorptionsmittel soll mindestens 1 : 200 sein. Mit anderen Worten, die chromatographischen Flecken müssen intensiv und scharf abgetrennt sein. Langgezogene, teilweise "schmierende" Flecken sind ungünstig.
- Die Substanz soll aus dem Schichtmaterial mit der kleinst möglichen Lösungsmittel-Menge extrahiert werden. Selbstverständlich verwendet man reine, frisch destillierte Lösungsmittel und vermeidet deren direkten Kontakt mit Plastik-Behältern (Kontaminations-Gefahr mit Weichmachern, Antioxydantien, etc.).
- Es ist bekannt, dass an den Wänden kleiner Glasgeräte farblose Substanzen in Milligramm-Mengen mit blossen Auge oft nicht erkennbar sind. Umso vorsichtiger muss man beim Umgang mit Mikrogramm-Mengen sein. Die Glasgeräte müssen sehr sauber und die Flächen, welche mit der Substanz in direktem Kontakt sind, sehr klein sein.
- Rückstände von Schichtmaterial müssen sorgfältig entfernt werden. SPITTELER (22) hat gezeigt, dass organische Verbindungen, wenn sie in Gegenwart von aktivem Kieselgel erhitzt werden, noch vor dem Verdampfen im Massenspektrometer sich zersetzen und dadurch den Untergrund des Massenspektrums erhöhen können. Im Laufe der DC-IR Mikrotransfer-Arbeiten haben wir bereits gelernt, wie man Schichtmaterial-Spuren durch KBr-Filtration entfernt. Diese Kenntnisse nützten wir bei der Entwicklung folgender DC-MS Mikrotransfer-Methoden aus.

a. DC-MS Mikrotransfer mittels Wick-Stick

Die Ueberführung wird zuerst in die Spitze eines Wick-Stick KBr-Prismas vorgenommen (vergl. Abschnitt 3.3.3). Dann wird die mit Substanzprobe angereicherte Spitze abgebrochen (Gewicht = ca. 10 mg) und in einem Achatmörser fein pulverisiert. Die Substanz lässt sich aus dem KBr mit wenig Lösungsmittel extrahieren. Diese Operation führt man z.B. in einem Mikrozentrifugen-Röhrchen aus und lässt anschliessend das KBr durch Zentrifugieren absetzen. Mit einer Mikropipette passender Grösse (z.B. 100 μ l) wird die Lösung in kleinen Portionen (je 2 - 5 μ l) auf das Ende eines 45 mm langen Glasstabes von 1 mm Durchmesser aufgetropft. Zuerst verwendeten wir Stäbchen aus Oxidkeramik, später Glasstäbchen. Das Lösungsmittel lässt man jeweils verdampfen; ggf. wird durch leichtes Erwärmen mit einer Infrarotlampe und/oder leichter Stickstoffströmung beschleunigt. Nachdem alles Lösungsmittel verdunstet ist, wird das Stäbchen in das Massenspektrometer eingeführt.

b. DC-MS Mikrotransfer mittels KBr-gefüllter Glaskapillare

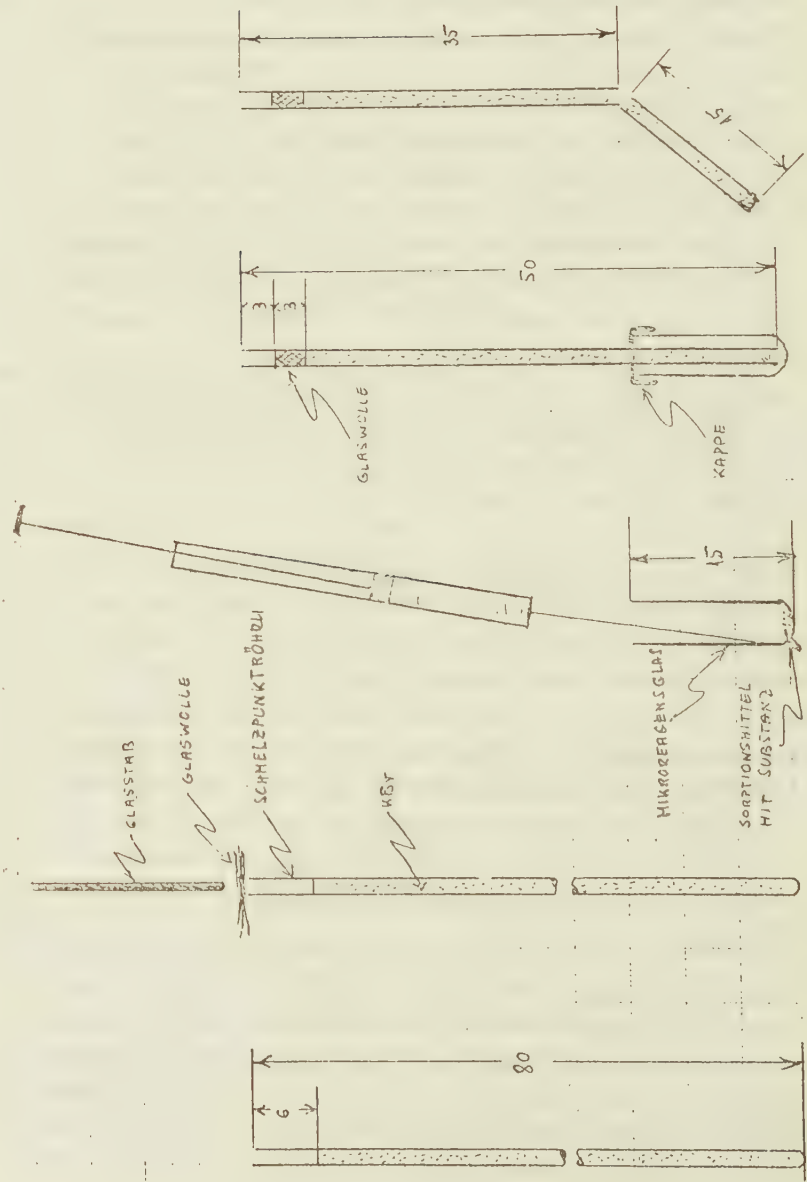
Folgende Ueberlegungen führten uns zu dieser Methode: wenn man die Substanz nicht aus KBr extrahieren, sondern direkt auf KBr in das MS-Gerät einführen würde, so könnte man eine Operation sparen. Wenn wir von "sparen" reden, dann denken wir nicht an Zeit oder Substanz, sondern an mögliche Kontaminationen. Denn jede zusätzliche Operation bringt neue, unerwünschte Verunreinigungen. Die direkte Einführung der Probe auf KBr sollte möglich sein, denn KBr ist ziemlich inert, nicht flüchtig und besitzt eine wesentlich geringere spezifische Oberfläche als der Kieselgel. Diese Ueberlegungen wurden auf nachfolgende Weise verwirklicht:

Ein ca. 80 mm langes Schmelzpunktröhrchen mit 1 mm Innendurchmesser wird mit feinpulverisiertem KBr (Korngrösse ca. 5 μ) bis 6 mm unterhalb des Randes gefüllt (Fig. 12/1). Dann wird ein 8 mm langes, mit Aceton gewaschenes Glaswolle-Büschel mit einem dünnen Glasstäbchen in das Schmelzpunktröhrchen gestopft (Fig. 12/2), so dass ein etwa 3 mm langer Pfropfen entsteht (Fig. 12/4).

Fig. 16

Schematische Darstellung des DC-MS Mikrotransfers mittels KBr-gefüllten Glaskapillaren

$$n_{\text{KBr}} : n_{\text{Glas}} = 2:1$$



Zur Erleichterung dieser Arbeit verwendet man am besten eine handelsübliche Leuchtlupe von minimal 10 cm Durchmesser. Das untere Ende des Röhrchens wird so abgeschnitten, dass eine 50 mm lange, mit KBr gefüllte Glaskapillare zur weiteren Verwendung zurückbleibt (Fig. 12/4). Der für den Mikrotransfer vorgesehene Fleck wird von der DC-Platte abgekratzt und in einem kleinen Reagensgläschen gesammelt. Zum Herauslösen der Substanz aus dem Sorptionsmittel werden mittels einer Mikrospritze ca. 30 μ l Lösungsmittel (z.B. Methylenchlorid, Aceton, Methanol) zugegeben (Fig. 12/3). Dann stellt man die vorbereitete Kapillare mit dem Glaswolle-Pfropfen nach oben in das Gläschen hinein und stützt sie mit einer Metallkappe (Fig. 12/4). Sobald das Lösungsmittel in die Säule aufgestiegen ist, werden weitere 30 μ l Lösungsmittel in das Gläschen gegeben. Dies wird, wenn notwendig, nochmals wiederholt, bis die Substanz in den oberen Teil der Säule gewandert ist. Bei farbigen Verbindungen kann die Ueberführung leicht beobachtet werden. Bei farblosen Substanzen hingegen muss die benötigte Lösungsmittelmenge in Vorversuchen ermittelt werden. Dazu wird eine KBr-Füllung mit Zusatz von 3 % anorganischem Fluoreszenzindikator (z.B. ZS Super der Fa. Riedel De Haen) verwendet und die Kapillare unter kurzweiligem UV-Licht nach Zugabe von jeweils 30, 60, 90 etc. μ l Lösungsmittel beobachtet. Der untere 15 - 20 mm lange Teil der Kapillare wirkt als Filter (Fig. 12/5). Nach Aufsteigen der letzten Portion Lösungsmittel wird dieser abgebrochen und weggeworfen. Der zurückgebliebene obere Teil enthält die gewünschte Substanz und wird in das Massenspektrometer eingeführt, nachdem auch das andere Ende der Säule mit Glaswatte zugestopft worden ist (Fig. 12/6).

3.4.4 Aufnahme der Massenspektren

Die Massenspektren wurden in der Firma Ciba-Geigy Basel, Spektroskopie, mit einem CEC 21-110 B Gerät aufgenommen. Der Probenkopf des Standard-Direkt-Einlass-Systems wurde leicht modifiziert, so dass die früher erwähnten Kapillaren bzw. Stäbchen darin befestigt werden konnten. Die Original-Heizung des Gerätes war durch eine spezielle, ausserhalb der Quelle angebrachte Probenheizung ersetzt.

Es wurden folgende Bedingungen eingehalten:

- Quellentemperatur: 100 - 200 °C
- Elektronenenergie: 70 eV
- Sekundärelektronenvervielfacher: Maximal Einstellung
- Auflösung: ca. 1000
- Scangeschwindigkeit: 8 sec/Oktave

3.4.5 Beispiele

a. Identifizierung von Spuren eines Diphenyläther-Derivates in Urin-Extrakt

Der Trockenrückstand eines Urinextraktes ist in Aceton löslich und zeigt im Dünnschichtchromatogramm mehrere Zonen. Eine dieser Zonen besitzt den gleichen chromatographischen Rf-Wert wie authentischer 2-Hydroxy-4,2',4'-trichlordiphenyläther. Die vermutete Identität sollte durch massenspektrometrische Untersuchung der mikrotransferierten Zone bestätigt werden.

Experimentelles

- Trenntechnik: aufsteigend auf 20 x 20 cm Platte
- Schicht: 0,25 mm Kieselgel GHR/UV₂₅₄ (Macherey, Nagel & Co.), aktiviert bei 110°
- Fliessmittel: n-Hexan-Methylenchlorid (50+50)
- Kammersättigung: ohne Filterpapier-Einlage
- Markierung der gesuchten Zone: unter UV₂₅₄
- Mikrotransfer-Technik: Die gesuchte Zone bei Rf 0.50 war ca. 30 µg stark. Sie wurde ausgekratzt und in der Spitze eines Wick-Sticks angereichert. Die Wick-Stick Spitze wurde pulverisiert, mit Aceton extrahiert und die Lösung in eine 100 µl Spritze aufgezogen. Dann wurde die Lösung auf das Ende eines Glasstäbchens aufgetragen.
- MS-Untersuchung: Die transferierte Probe wurde von Herrn Dr. W. Richter (Firma Ciba-Geigy Basel, Spektroskopie) untersucht. Das Massenspektrum der transferierten Probe erwies sich als identisch mit dem Massenspektrum des authentischen 2-Hydroxy-4,2',4'-trichlor-diphenyläthers. Charakteristische

Massenpeaks werden bei m/e 288/290/292 (3:3:1), 3 Chlor-Atome (Moleküllion-Peaks), m/e 252/254/256 (2 Chlor-Atome, M-HCl) und m/e 218/220 (3:1), 1 Chlor-Atom, M-(HCl/Cl) beobachtet.

b. Isolierung und Strukturaufklärung eines Metaboliten

15 mg 2-Aethylamino-4-tert.butylamino-6-methoxy-s-triazin wurde in 300 ml Nährlösung, bestehend aus anorganischen Salzen in Wasser, gelöst und zum biologischen Abbau drei Monate bei Raumtemperatur belassen. Die DC-Kontrolle im System Kieselgel G/n-Heptan-Isoamylalkohol (70+30) zeigte, dass die Triazin-Lösung ziemlich verändert war und aus 3 Zonen bestand.

Zone A = 60 % unveränderte Triazin-Verbindung

Zone B = 20 % 2-Amino-4-tert.butylamino-6-methoxy-s-triazin

Zone C = 20 % Hydroxy-Verbindungen

Anschliessend stellte man fest, dass die Zone B im DC-System Kieselgel G/Chloroform-Aceton (70+30) sich in weitere 2 Zonen trennt:

Zone B1 = unbekannter Metabolit

Zone B2 = 2-Amino-4-tert.butylamino-6-methoxy-s-triazin.

Das Verhältnis von B1 : B2 war ca. 1 : 1. Unsere Untersuchung hatte zum Ziel, den unbekannten Metaboliten (= Zone B1) aus der uns übergebenen Nährlösung zu isolieren und dessen Struktur zu bestimmen.

Isolierung und Mikrotransfer

Die uns übergebenen 300 ml Nährlösung enthielten ca. 1,5 mg des gesuchten Metaboliten. Die Nährlösung wurde mit zweimal 200 ml frisch destilliertem Chloroform extrahiert und in einem Herzkolben am Vakuumrotationsverdampfer auf 1 ml Volumen eingengt. Die DC-Kontrolle zeigte, dass die Zonen A und B in die Chloroform-Phase übergegangen waren, während die Zone C wie erwartet in der wässrigen Phase zurückblieb. Die Chloroform-lösliche Phase wurde auf eine mit Kieselgel PF₂₅₄ Merck beschichtete

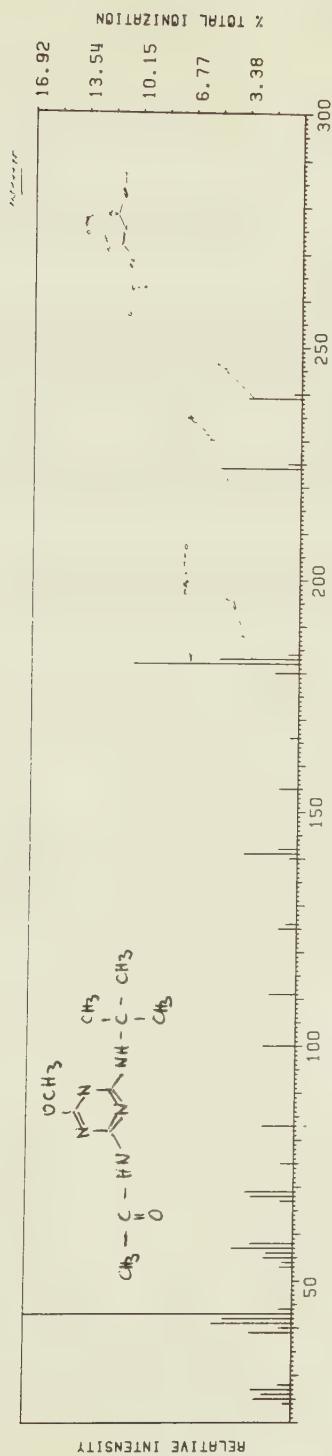
Platte (20 x 20 cm) aufgetragen und mit n-Heptan-Isoamylalkohol (70+30) chromatographiert. Die Zone B wurde mit Chloroform-Methanol (80+20) extrahiert, auf eine weitere Kieselgel PF₂₅₄ Platte aufgetragen und mit dem Fließmittel Chloroform-Aceton (70+30) in den bereits erwähnten Zonen B1 und B2 aufgetrennt. Die Zone B1 wurde aus dem Schichtmaterial mit Chloroform-Methanol (80+20) extrahiert, worauf die analytische DC-Kontrolle einen einheitlichen Fleck zeigte. Darauf wurde der Extrakt auf der Spitze eines Wick-Sticks angereichert, von dort aus extrahiert und auf einem Glasstäbchen zur Aufnahme der Massenspektren präpariert.

Massenspektroskopische Untersuchung (Dr. W. Richter, Fa. CIBA-GEIGY AG.)

Das Massenspektrum Nr. 11.125 der transferierten Zone B1 (Fig. 13) zeigt einen Molekülion-Peak bei m/e 239, i.e. 14 Masseneinheiten höher als das Ausgangsmaterial. Daraus folgt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Inkorporation eines Sauerstoffatoms unter Verlust von 2 Wasserstoffatomen ($-CH_2- \rightarrow -C=O$). Dass eine solche Oxidation am α -C-Atom der N-Aethyl-Gruppe stattgefunden hat, ergibt sich aus den 3 Hauptfragmenten des oberen Massenbereichs, m/e 224, 183 und 182, die dem Verlust eines CH_3 Radikals bzw. Isobuten-Moleküls aus der tert. Butylgruppe (M-15 bzw. M-56), sowie der Eliminierung von Keten (42 ME) aus dem M-15 Fragment entsprechen. Während die beiden ersten Prozesse die Anwesenheit eines intakten tert. Butyl-Restes anzeigen, folgt die Gegenwart einer N-Acetylaminogruppe mit hoher Wahrscheinlichkeit aus letzterem Prozess, der für diese Teilstruktur sehr charakteristisch und ausserdem durch die Beobachtung eines metastabilen Peaks für den Uebergang m/e 224 $\rightarrow$ m/e 182 gesichert ist. Komplementäre Information zugunsten des N-Acetyl-Restes ergibt sich ferner aus dem Basispeak des Spektrums, m/e 43 (CH_3CO^+).

Das auf Grund dieses Strukturvorschlages dargestellte Acetylierungsprodukt erwies sich als Monoacetylderivat und als eindeutig mit Zone B1 identisch.

Massenspektrum (Nr. 11.125) des gesuchten Metaboliten



3.5. Literatur

- /1/ J.G. KIRCHNER, Thin-Layer Chromatography, Interscience Publishers, New York - London - Sydney, (1967), S. 151-186
- /2/ K. RANDERATH, Dünnschicht-Chromatographie, Verlag Chemie, Weinheim, (1965), S. 63-68
- /3/ E. STAHL, Dünnschicht-Chromatographie, Ein Laboratoriums-handbuch, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 2. Aufl., (1967), S. 815-856
- /4/ H.J. MONTEIRO, J. Chromatogr., 18.594 (1965)
- /5/ N. ZOELLNER, G. WOLFRAM, *Mik. Wschr.*, 40.1098 (1962)
- /6/ J.A. THOMA, J. Chromatogr., 12.441 (1963)
- /7/ L. STARKA, R. HAMPL, J. Chromatogr., 12.347 (1963)
- /8/ H. HALPAAP, Chem. Ing. Techn., 35, 488 (1963)
- /9/ H. HALPAAP, Chem. Ztg., 89.835 (1965)
- /10/ J.G. KIRCHNER et al., Analyt. Chem., 23.420 (1951)
- /11/ K.O. ALT, W. RICHTER, Private Mitteilung, Ciba-Geigy Basel, Physik, Spektroskopie
- /12/ E. STAHL, Z. Analyt. Chem., 221.3 (1966)
- /13/ V. CERNY, J. JOSKA, L. LABLER, Collect. Czech. Chem. Com., 26.1658 (1961)
- /14/ R. FONTANGES, P. HERITIER, P. COEUR, Bull. Soc. Chim. Biol., 46.1223 (1964)
- /15/ R.N. MCCOY, E.L. FIEBIG, Anal. Chem., 37.593 (1965)
- /16/ N. NASH, P. ALLEN, A. BEVENUE, H. BECKMANN, J. Chromatogr., 12.421 (1963)
- /17/ M.K. SNAVELY, J.G. GRASSELLI, Develop. Appl. Spectr., 3.119 (1963)
- /18/ K. BEYERMANN, E. ROEDER, Z. Anal. Chem., 230.347 (1967)
- /19/ H.R. GARNER, H. PACKER, Appl. Spectr., 22.122 (1967)

- [20] D.D. RICE, Anal. Chem., 39.1907 (1967)
- [21] W.J. De KLEIN, Anal. Chem., 41.667 (1969)
- [22] M. SPITZER, Private Mitteilung, Ciba-Geigy Basel
- [23] R. DELLEY, K. FRIEDRICH, B. KARLHUBER, G. SZEKELY,
K. STAMMBACH, Z. Analyt. Chem., 228.23 (1967)
- [24] K.O. ALT, Private Mitteilung, Ciba-Geigy Basel
- [25] M. FETIZON, in G.B. MARINI-BETTOLO (Herausgeber), Thin-
Layer Chromatography, Elsevier, Amsterdam - London - New York,
(1964), S. 69
- [26] K. HEYNS, H.F. GRUETZMACHER, Angew. Chem., 74.387 (1962)
- [27] W.H. McFADDEN, Separation Science, 1.723 (1966)
- [28] A. ZEMAN, I.P.G. WIROTAMA, Z. Anal. Chem., 247.155 (1969)
- [29] G. SPITTELER, in H. KIENITZ (Herausgeber), Massenspektrometrie,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstrasse, (1968), S. 427
- [30] M.A. SCHWARTZ, P. BOMER, F.M. VANE, Arch. Biochem. Biophys.,
121.508 (1967)
- [31] M.A. SCHWARTZ, F.M. VANE, E. POSTMA, Biochem. Pharmacology,
17.965 (1968)
- [32] R. KAISER, Chem. Britain, 5.54 (1969)

4. QUANTITATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE

4.1. Die visuelle Auswertung

Die dünnschichtchromatographisch getrennten Komponenten eines Substanzgemisches können mit Hilfe von Vergleichsflecken bekannter Konzentration visuell ausgewertet werden. Diese Methode beruht auf der einfachen Tatsache, dass die Grösse sowie die Farbtintensität der Flecken mit steigender Konzentration zunimmt. Diese Auswertungsart wird allgemein als so selbstverständlich betrachtet, dass nur wenige Autoren darüber berichtet haben, z.B. GÄNSHIRT [1], JOHNSON [2], WALDI [3].

Trotzdem lohnt es sich, dieses Problem etwas näher zu betrachten, denn die visuelle Methode ist die

- rascheste und die
- meistgebrauchte Auswertungsart.

Bei richtiger Anwendung liefert diese Methode befriedigende Genauigkeit.

Um möglichst gute Resultate zu erhalten, muss man folgende einfachen Regeln einhalten:

- a) Die Probe und die Vergleichssubstanzen müssen auf der gleichen DC-Platte chromatographiert werden. Z.B.: die Auswertung der Proben von einer Platte mit Hilfe von Vergleichssubstanzen von einer zweiten Platte, führen zu grösseren Fehlern, weil die DC-Bedingungen von Platte zu Platte nicht genügend genau reproduziert werden können (Schichtdicke, Kammer sättigung etc.).
- b) Die aufgetragenen Volumina der Proben- und der Vergleichslösungen müssen konstant sein und betragen in der Regel 2 bis 10 µl. Es ist also nicht empfehlenswert, die Vergleichsmengen durch Volumenänderung zu variieren. Nicht das Volumen, sondern die Konzentration der Lösungen muss geändert werden. Begründung: die Fläche des chromatographierten Fleckens ist in erster Linie von der Fläche des ursprünglich (auf dem Startpunkt) aufgetragenen Flecks abhängig. Z.B.: die gleiche Substanzmenge in 2 bzw. 5 µl Lösungsmittel aufgetragen, ergibt unterschiedlich grosse Flecken.

- c) Die Sprühreagenzien müssen gleichmässig dosiert werden. Die stärkere Besprühung einer Plattenseite kann zu Fehlern führen.
- d) Bei UV-Licht-Auswertungen müssen die Augen ans Dunkel gewöhnt werden.
- e) Es ist vorteilhaft, die gleiche Platte von mehreren Personen auswerten zu lassen.

Bei der visuellen Auswertung unterscheidet man folgende 2 Fälle:

Fall 1: die Nebenkompente(n) ist (sind) bekannt und steht (stehen) in ausreichender Reinheit und Qualität zur Verfügung.

Fall 2: die Nebenkompente(n) ist (sind) unbekannt und steht (stehen) nicht zur Verfügung.

Fall 1: Nebenkompente(n) bekannt

Fall 1 ist der günstigste Fall. Nebst einem guten Trennsystem muss man auch für die richtige Einteilung der Platten besorgt sein. Bei 15 mm Abständen zwischen den Startflecken kann man pro 20 x 20 cm DC-Platte 11 Auftropfungen vornehmen. Beim merkbaren Randeffekt sollen die beiden äussersten Bahnen weggelassen werden. Um die Platteneinteilung besser zu illustrieren, stellen wir uns ein organisches Präparat P vor, in welchem eine erwartete Nebenkompente V bestimmt werden muss. Hat man gar keinen Anhaltspunkt über die erwartete Menge von V, so wählt man eine ziemlich weite und grobe Eichreihe von V. Die unterste Konzentration soll jeweils bei der Nachweisgrenze beginnen und wird auf die ca. 100-fache Menge erhöht. Die Einteilung würde etwa so aussehen:

Tab. 1

Einteilung der DC-Platte für die semiquantitative Bestimmung.

Interval = 0,1-10 % Nebenkompente

Start Nr.	aufgetragen
1	Probe 1
2	0,1 % Nebenkompente = Erfassungsgrenze der Methode
3	0,5 % Nebenkompente
4	1,0 % Nebenkompente
5	Probe 2
6	2,0 % Nebenkompente
7	5,0 % Nebenkompente
8	10,0 % Nebenkompente
9	Probe 3

Erfahrungsgemäss liegt die relative Standardabweichung (s_{rel}) bei so einer groben Einteilung bei ca. ± 50 %. Handelt es sich um schwache Nebenkompenten von unter 1 %, genügt bereits diese Genauigkeit für den grössten Teil der Anforderungen.

Es ist manchmal wünschenswert, eine noch grössere Genauigkeit zu erhalten. Diese erreicht man durch wiederholtes Auftragen von ein und derselben Probe und einer enger gewählten Eichreihe. Diese Einteilung könnte bei einer erwarteten Menge von ca. 1 % etwa so aussehen:

Tab. 2

Einteilung der DC-Platte für die semiquantitative Bestimmung.

Interval = 0,6-1,4 % Nebenkomponente

Start Nr.	aufgetragen
1	0,6 % Nebenkomponente
2	Probe 1
3	0,8 % Nebenkomponente
4	Probe 1
5	1,0 % Nebenkomponente
6	Probe 1
7	1,2 % Nebenkomponente
8	Probe 1
9	1,4 % Nebenkomponente

Um die Genauigkeit der visuellen Auswertung zu zeigen, haben wir folgendes Experiment ausgeführt: durch exakte Einwaage haben wir 1,30 % 2-Naphtol p.a. zur nebenfleckfreien 2-Hydroxy-3-naphtoesäure zugegeben und das Gemisch in Aceton gelöst. Diese Lösung wurde von 6 verschiedenen, dünn-schicht-chromatographisch geschulten Personen chromatographiert. Selbstverständlich wurde der Gehalt von 2-Naphtol nicht bekannt gegeben und jeder Ausführende hat die Eichreihen selber hergestellt. Man hat auf Kieselgel-G-Schicht mit Tetrachlorkohlenstoff-Eisessig (90+10) chromatographiert und der Nachweis erfolgte mit Diazoechtrot B. Nach einer ersten groben Schätzung wurde jeweils mit einer engen Eichreihe analog der oben erwähnten gearbeitet und dabei wurden folgende Resultate ermittelt:

Tab. 3

Beispiel einer semiquantitativen Analyse

Laborant A	1,0 %	2-Naphtol
" B	1,2	"
" C	1,3	"
" D	1,3	"
" E	1,5	"
" F	1,6	"
Arithmetisches Mittel = 1,32 % (Theorie = 1,5 %)		
Relative Standardabweichung (s_{rel}) = ± 10 %		

Wie später bei den direkten spektrophotometrischen Messungen gezeigt wird, ist die Standardabweichung auch bei der visuellen Auswertung von der Substanzmenge im Fleck abhängig. Die optimale µg-Menge liegt meistens 5-50 mal höher als die Erfassungsgrenze. In der Nähe der Erfassungsgrenze sowie bei noch höheren Konzentrationen als erwähnt, muss man mit schlechteren Genauigkeiten rechnen. Während bei höheren Konzentrationen durch entsprechende Verdünnung Abhilfe geschaffen werden kann, kann man bei kleinen Konzentrationen höchstens durch Herabsetzung der Erfassungsgrenze helfen (bessere Nachweis-methode, Erhöhung der aufgetragenen Menge).

Fall 2: Nebenkomponente (n) unbekannt

In diesem Fall kann man die Auswertung mit Hilfe einer fremden Testsubstanz versuchen. Diese soll annähernd den gleichen R_f -Wert haben ($R_f = \pm 0,2$) wie die auszuwertende Zone, denn die Flächen chromatographischer Flecken sind von der Wanderungsstrecke abhängig. Je grösser der R_f -Wert, desto grösser die seitliche Diffusion. Der Durchmesser der Flecken in der Nähe der Lösungsmittelfront ist meistens 3 mal so gross wie in der Nähe der Startlinie. Ausserdem soll die fremde Testsubstanz aus der gleichen chemischen Substanzklasse stammen. Bei der Reinheitsprüfung organischer Präparate werden Nebenkomponenten oft mit einer Eichreihe der Hauptkomponente ausgewertet. Als Beispiel wird die Bestimmung einer unbekannten Nebenkomponente in einer Triazin-Verbindung erwähnt. Nachträglich wurde diese Unbekannte aufgeklärt und die Analyse mit der authentischen Substanz ausgeführt:

Tab. 4

Auswertung mit authentischer und nichtauthentischer Vergleichssubstanz

Probe	Auswertung mit Hauptkomponente	Auswertung mit authentischer Vergleichssubstanz
1	1,5 %	0,5 %
2	1,0	0,3
3	0,5	0,2
4	0,2	< 0,1
5	0,2	< 0,1

Dieses Beispiel zeigt, dass die Auswertung mit der Hauptkomponente etwa 3 mal höhere Werte ergeben hat. Sie war aber trotzdem nützlich, denn man hat so eine Rangliste der 5 Proben erhalten: die saubersten sind die Proben 5 und 4, dann folgen 3, 2 und schliesslich 1.

Eine weitere Möglichkeit der visuellen Auswertung - ohne authentische Vergleichssubstanzen - ist die Verwendung von Typ-Substanzen. Diese wird in der Kontrollanalytik praktiziert, also dort, wo die Qualität eines Produktes laufend geprüft wird. Eine in der Praxis bewährte Charge wird als Typ deklariert und die Nebenflecken des Typs willkürlich gleich 100 gesetzt und als Bezugsgrösse für die Analyse weiterer Proben benützt. Man arbeitet z.B. nach folgendem Schema [4]:

Tab. 5

Einteilung der DC-Platte für die semiquantitative Auswertung mittels Typ-Substanz (ohne authentische Vergleichssubstanz)

Start n.r.	aufgetragen
1	100 µg Probe
2	50 µg Typ
3	100 µg Probe
4	100 µg Typ
5	100 µg Probe
6	200 µg Typ
7	100 µg Probe
8	400 µg Typ
9	100 µg Probe

Bei der Auswertung wird festgestellt, ob die einzelnen Nebenflecken der untersuchten Probe etwa der Intensität eines gleichen Nebenflecks aus der Konzentrationsreihe des Typs oder evtl. einem Zwischenwert entsprechen. Für die Konzentrationsangaben jeder Nebenkomponente bestehen somit bei obgenanntem Auftragungsschema folgende 9 Möglichkeiten:
< 50/50/75/100/150/200/300/400/ >400

4.2. Die spektroskopische Auswertung nach Extraktion aus den Sorptionsschichten

Falls die Genauigkeit der visuellen Auswertung nicht ausreicht, kann man die getrennten Zonen auskratzen, extrahieren und spektrophotometrisch bestimmen (im UV oder VIS-Bereich). Dabei kann man relative Standardabweichungen von ca. 2-3 % erzielen. Diese als sehr befriedigend bezeichnete Genauigkeit muss mit einem relativ hohen Zeitaufwand bezahlt werden. Schon nur für die Ausarbeitung der Methode braucht man eine bis mehrere Wochen.

4.2.1 Einteilung der DC-Platten und Auftragen der Probelösungen

Die DC-Platte wird je nach erwartetem Gehalt (schwache oder starke Komponente) sowie nach der Art der Endbestimmung eingeteilt. Da wir kein Mikroinstrument, sondern ein normales Spektrophotometer mit 1 cm Quvetten verwendeten, reichte die Substanzmenge gewöhnlicher DC-Flecken nur selten aus. Deshalb teilten wir die 20 x 20 cm Platte meistens in nur 3 Bahnen à 6 cm Breite ein und trugen die Lösungen bandförmig auf. Man muss eine gewisse Übung bekommen und darf die Schicht auf keinen Fall verletzen. So eine Auftragung gelingt z.B. mit der bekannten AGLA-Spritze, wenn man Pul-weise, Tropfen neben Tropfen so aufträgt, dass die Kreise sich überschneiden:  Auf der mittleren Bahn trugen wir die zu analysierende Probe auf, links und rechts flankiert von 2 Eichwerten. Die Konzentration des einen Vergleichswertes war kleiner, die des anderen grösser als in der Probe zu erwarten war. Z.B.: bei einem erwarteten Gehalt von 50 % Komponente, chromatographiert man auf die gleiche Platte Vergleichswerte von 40 bzw. 60 %.

4.2.2 Lokalisierung der Flecken

Nach erfolgter Trennung müssen die Komponenten auf der DC-Platte lokalisiert werden. Da fast alle von uns geprüften Verbindungen im UV-Bereich Licht absorbieren, konnten wir sie auf Fluoreszenz-Indikator enthaltenden Platten, unter kurzwelligem UV-Licht, erkennen. Im UV oder Tageslicht nicht sichtbare Verbindungen kann man mit geeigneten Sprühreagenzien sichtbar machen. Der Fleck muss anschliessend ausgekratzt und extrahiert werden. Auf diese Weise haben wir z.B. eine Aminosäure mit Ninhydrin-Reagens besprüht, den farbigen Fleck ausgekratzt, mit Reagens extrahiert und photometrisch gemessen. Diese Sprühmethode versagt, wenn die entstandenen farbigen Produkte sich schwer lösen und sich aus dem Schichtmaterial nicht mehr extrahieren lassen. Theoretisch besteht noch die Lokalisierung nach Rf-Wert, aber diese ist nicht zu empfehlen, da durch unerwartete Fleckendeformation, Randeffekte etc., Verluste entstehen können. Man kann aber die gewünschten Zonen mit farbigen oder UV-sichtbaren Leitverbindungen markieren (vergl. präparative DC).

4.2.3 Die Extraktion

Die lokalisierte Zone wird mit einem geeigneten Spatel ausgekratzt und vorsichtig, ohne Verluste, in ein geeignetes Gefäss (Reagensglas) überführt. Am besten arbeitet man so, dass man zuerst das Schichtmaterial um die gewünschte Zone ganz entfernt und den zurückgebliebenen Fleck auf eine Alufolie sammelt, bevor man ihn in das Gefäss einführt. Mit einem geeigneten Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemisch dauert die Extraktion einige Minuten. Mechanisches Schütteln beschleunigt die Extraktion (z.B. Automatic-Mixer der Fa. Bender & Hobein AG. Zürich). Pro cm^2 Schichtmaterial verwendeten wir 1 ml Lösungsmittel. Das Schichtmaterial wird beim Filtrieren durch G 4 Glasfilter weitgehend entfernt. Feine Kieselgelkörner können sonst ins Filtrat gelangen und sie bei der Endbestimmung stören, hauptsächlich dann, wenn unter 240 nm, im kurzwelligen UV-Bereich gemessen wird (Streulicht!). In solchen Fällen nützt eine ca. 15 min Zentrifugierung, und zwar mit Christ Junior O Zentrifuge (relative Zentrifugalbeschleunigung = 3000 g). Ein mindestens einmaliges Nachwaschen des Gefässes und der Nutsche ist empfehlenswert.

Ein ganz entscheidender Punkt ist die Wahl des Extraktionsmittels. Eine 100 %ige Extraktionsausbeute ist in der Regel nicht zu erreichen, meistens bleiben einige % Substanz im Schichtmaterial. Dieser Anteil kann in Vorversuchen mit nicht chromatographierten Flecken ermittelt werden. Wir haben die Extraktionsmittel so geprüft, indem wir sie zuerst als Fliessmittel einsetzten. Wanderte die Verbindung mit grossem Rf-Wert, so war die Chance gross, dass das Extraktionsmittel richtig war. Unserer Meinung nach ist die unvollständige Extraktion die wichtigste Fehlerquelle bei diesen Bestimmungen. Um diese Fehler möglichst gering zu halten, müssen die Vergleichswerte auf die gleiche Platte mitchromatographiert und gleich wie die Probe behandelt werden.

4.2.4 Die Endbestimmung

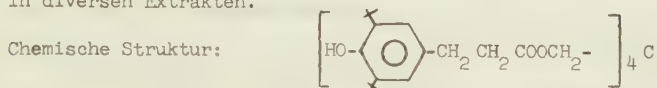
Den klaren Extrakt haben wir in eine 1 cm Quarzküvette überführt und in einem Beckman DB-G-Spektrophotometer gemessen. Wenn immer möglich, haben wir im UV-Bereich gearbeitet, da Farbreaktionen zusätzliche Fehlerquellen mit sich bringen. Die Vergleichsküvette wurde mit Blindextrakt gefüllt. Die Berechnung erfolgte entweder graphisch oder mit Hilfe der linearen Interpolationsformel.

4.2.5 Vorsichtsmassnahmen

Alle denkbaren Verunreinigungen aus dem Schichtmaterial, den Lösungsmitteln oder der Atmosphäre, können bedeutende Fehler verursachen, und der Gehalt dieser Substanzen muss möglichst niedrig gehalten werden. Nur ganz saubere Glaswaren, inkl. Trägerplatten, saubere Lösungsmittel, staub- und dampf- arme Luft sowie gut überlegte und sorgfältige Arbeitsweise kann zu wirklich befriedigenden Resultaten führen.

4.2.6 Anwendungsbeispiele

- a) Bestimmung des Antioxydantes IRGANOX 1010^(R) der Fa. CIBA-GEIGY AG.
in diversen Extrakten.



Chromatographisches System: Kieselgel GF₂₅₄/Methylenchlorid-n-Hexan (80+20)

Substanzmenge: 200-800 µg IRGANOX 1010, aus 100 µl Lösung,
bandförmig aufgetragen

Lokalisierung: UV₂₅₄ nm

Extraktion: mit Methylenchlorid bei Raumtemperatur

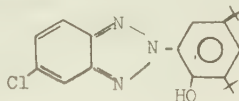
Messung: bei 283 nm

Anzahl Bestimmungen: 9

Relative Standardabweichung: ± 2,5 %

- b) Bestimmung des Lichtschutzmittels TINUVIN 327^(R) der Fa. CIBA-GEIGY AG.
in diversen Extrakten.

Chemische Struktur:



Chromatographisches System: Kieselgel GF₂₅₄/Cyclohexan

Substanzmenge: 30-120 µg aus 50 µl Lösung, bandförmig auf-
getragen

Lokalisierung: UV₂₅₄ nm

Extraktion: mit Methylenchlorid bei Raumtemperatur

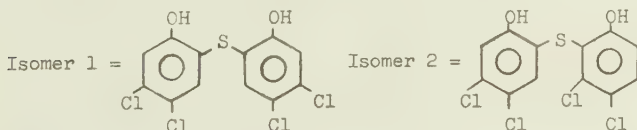
Messung: bei 354 nm

Anzahl Bestimmungen: 10

Relative Standardabweichung: ± 1,7 %

- c) Bestimmung des Isomerenverhältnisses in einem Forschungspräparat

Chemische Struktur:



Chromatographisches System: Kieselgel GF₂₅₄/Methylenchlorid-Ameisensäure
(99+1)
Substanzmenge: 500 µg Isomerengemisch aus 100 µl Lösung
Lokalisierung: UV₂₅₄ nm
Extraktion: mit Aceton-Eisessiggemisch (95+5)
Messung: bei 327 nm
Anzahl Bestimmungen: 20
Relative Standardabweichung: $\pm 4,5 \%$

4.3. Die direkte "in situ" Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen

durch Remissionsspektrophotometrie im UV-VIS-Bereich

4.3.1 Prinzip der Methode

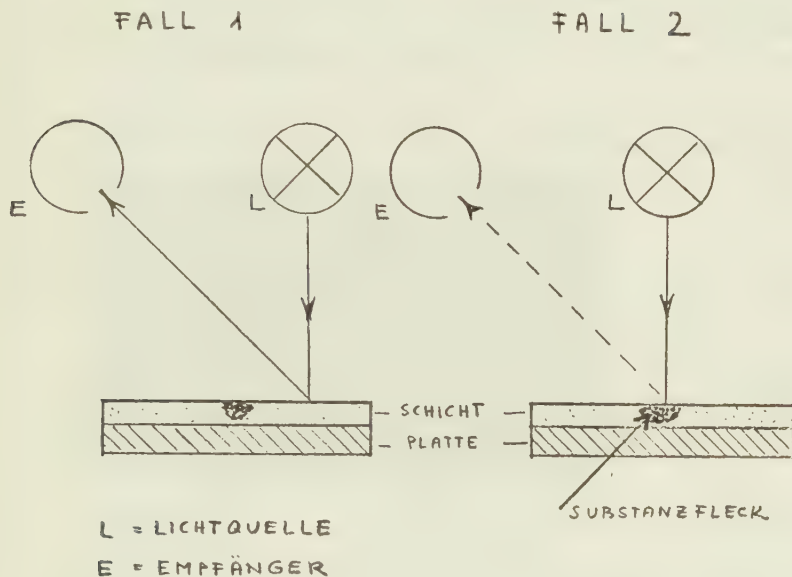
Das Ziel der direkten spektrophotometrischen Auswertung ist die Ersetzung der visuellen semiquantitativen Beurteilung durch eine quantitative aber gleich rasch ausführbare Messung. Die zu diesem Kapitel beschriebenen Arbeiten wurden mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer der Fa. Carl Zeiss (nach Prof. E. Stahl), Oberkochen BRD, ausgeführt.

Das Prinzip der Remissionsmessung ist folgendes:

Die DC-Platte wird mit praktisch monochromatischem Licht von konstanter Wellenlänge, wählbar zwischen 220-800 nm, bestrahlt. Die Strahlung dringt je nach Wellenlänge mehr oder weniger tief in die Schicht ein, kehrt nach wiederholter Streuung an die Oberfläche zurück und wird als "diffuse Reflexion" (Remission) mit Hilfe eines lichtelektrischen Empfängers gemessen:

Fig. 1

Schematische Darstellung der Remissionsmessung



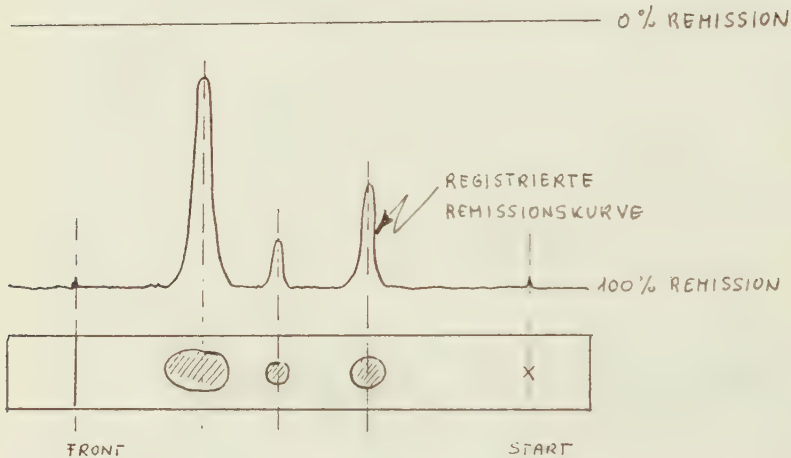
Fall 1: Die Strahlung trifft die reine Sorptionsschicht und wird von dieser ziemlich stark remittiert. Die Remission der substanzfreien Schicht wird als 100 % betrachtet.

Fall 2: Die Strahlung trifft einen DC-Fleck, wobei ein Teil des Lichtes absorbiert und ein anderer Teil remittiert wird. In diesem Fall ist die remittierte Strahlung weniger intensiv als im Fall 1.

Das Signal des Empfängers (= Elektronenvervielfacher) wird verstärkt und von einem Kompensationsschreiber registriert. Die DC-Platte wird mit konstanter Geschwindigkeit, parallel zu der Laufrichtung automatisch an der Messfläche vorbeigeführt. Als Messergebnis entsteht für jeden Fleck eine Kurve:

Fig. 2

Schematische Darstellung eines Chromatogramms und der dazugehörigen Remissionskurve



Die Fläche oder die Höhe der Kurve ist ein Mass für die Substanzmenge aus dem DC-Fleck. Die Methode ist relativ und die quantitative Auswertung erfolgt mittels Vergleichsflecken bekannter Konzentrationen. Als Standardsubstanz eignen sich diejenigen Substanzen am besten, welche gerade gemessen werden. Die Reproduzierbarkeit der spektrophotometrischen Auswertung ist normalerweise viel besser als diejenige der chromatographischen Trennung. Mit anderen Worten: die wichtigsten Fehler werden nicht bei der Auswertung, sondern bei der Trennung verursacht. Je nach der Güte der Chromatogramme haben wir in der Praxis relative Standardabweichungen von $\pm 2-5 \%$ berechnet.

4.3.2 Beschreibung des Gerätes

Das Chromatogramm-Spektralphotometer der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen BRD, ist aus den Teilen eines PMQ II Spektralphotometers aufgebaut. Der Messkopf und der Kreutztisch sind neu entwickelt worden. Untenstehende Foto zeigt die Gesamtansicht des Gerätes.

Fig. 3

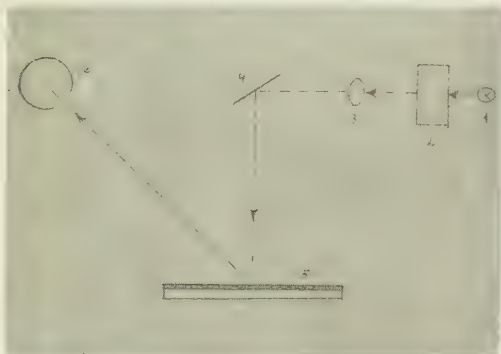
Gesamtansicht des Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometers



Das Gerät kann mit wenigen Handgriffen für Remissions-Transmissions- oder Fluoreszenzmessungen umgebaut werden.

Fig. 4

Schematische Darstellung des Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometers. Anordnung für Remissionsmessung



Bei den Remissionsmessungen gibt es folgenden Strahlengang:

1. Lichtquelle
2. Monochromator
3. Zwischenoptik aus Quarz
4. Umlenkspiegel
5. Chromatogramm
6. Empfänger

Das Licht von der Lampe geht zuerst durch den Monochromator. Die Zwischenoptik aus Quarz bildet den Austrittsspalt des Monochromators auf die Plattenoberfläche ab. Das Licht fällt senkrecht auf die Platte. Das remittierte Licht gelangt zu dem Empfänger, welcher in einem Winkel von 45° zur Platte placiert ist.

Das käufliche Zeissgerät wurde durch ein speziell bestelltes Steuerungsgerät ergänzt. Dieses wurde von der Fa. Zeiss Zürich, (ehemals Ganz Optar AG) gebaut und ermöglicht:

- a) Das vollautomatische Abtasten aller Bahnen einer DC-Platte.
(Die Verschiebung von Bahn zu Bahn geschieht mit Hilfe eines zusätzlichen Servomotors, die Einstellung ist auf $1/10$ mm genau möglich.)
- b) Das automatische mäanderförmige Abtasten der Flecken. (Die Mäanderschritte sind ebenfalls auf $1/10$ mm genau wählbar.)

4.3.3 Besprechung des "Abtastens" und der Auswertung

Es ist offensichtlich, dass die Peakfläche mit der Substanzmenge aus dem DC-Fleck in einem gewissen Verhältnis steht. Wenn man die Konzentration ($= \mu\text{g}$ pro Fleck) auf die Ordinate und die Peakfläche auf die Abzisse aufträgt, erhält man im Falle einer Eichreihe zuerst eine steigende Gerade, welche sich dann mit zunehmender Konzentration verflacht und asymptotisch zur Ordinate wird. Die Konzentration eines Fleckes kann mit Hilfe von solchen Eichkurven bestimmt werden. Diese Relation zwischen Peakfläche und Konzentration wird am häufigsten verwendet.

Die Messung der Peakflächen ist jedoch mit gewissen Nachteilen verbunden:

- a) Die elektronischen Integratoren sind teuer und arbeiten nicht immer befriedigend. Bei den Einstrahlgeräten, wie dies bei dem verwendeten Zeissgerät der Fall ist, kann man die Unregelmässigkeiten der Null-Linie nicht korrigieren.
- b) Das manuelle Planimetrieren ist zeitraubend und mit mindestens 1-2 % relativer Standardabweichung verbunden.

Deshalb versuchten wir, anstelle der Peakfläche die etwas seltener verwendete Peakhöhe zu berücksichtigen. Es hat sich gezeigt, dass die empirische Relation zwischen Konzentration (μg Menge pro Fleck) und Peakhöhe durchaus brauchbare Werte ergibt. Als Beispiel zeigen wir anschliessend die Eichkurve von Iminostilben, wobei die Flächen- und Höhenkurven einen sehr ähnlichen Verlauf haben.

PEAK HÖHE, cm oder
PEAK FLÄCHE, cm²

HÖHE

FLÄCHE

FIG. 5

EICHKURVE MIT PEAK HÖHE BZW FLÄCHE

SUBSTANZ = IMINOSTILBEN

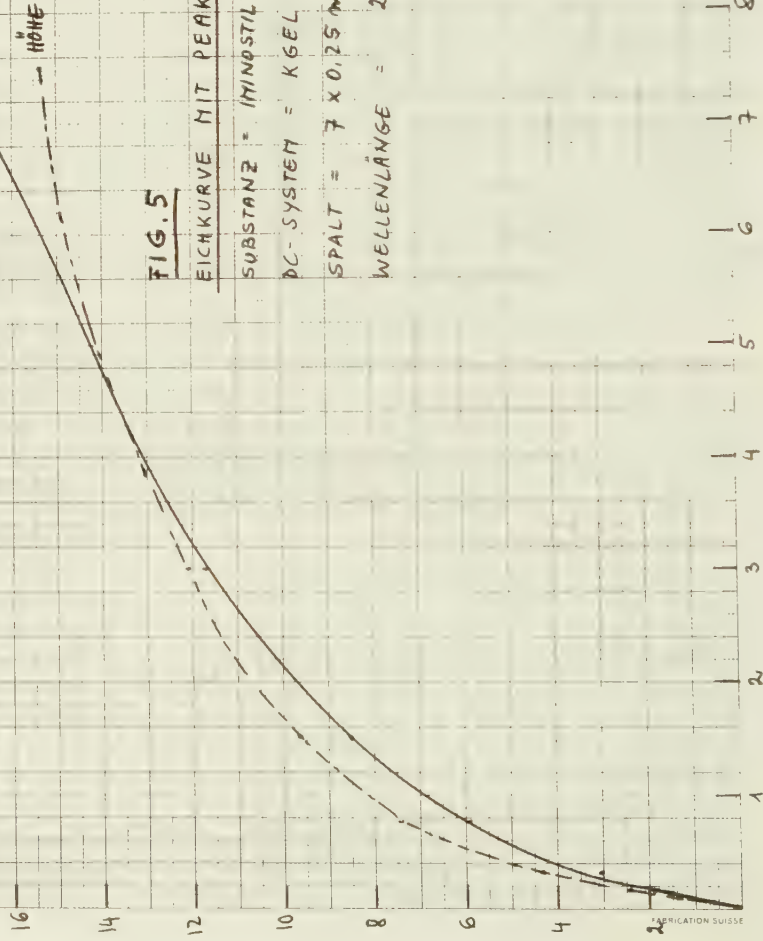
DC-SYSTEM = K GEL G/BENZOL-ESSIGESTER (70/30)

SPALT = 7 x 0,25 mm

WELLENLÄNGE = 250 nm

KONZENTRATION, µg
PRO SPOT

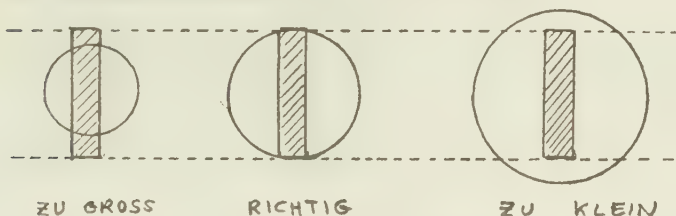
FABRICATION SUISSE



Ein anderes Problem bei der Auswertung ist die Wahl der Spalthöhe. Die ideale Spalthöhe ist identisch mit der Breite des DC-Flecks, damit der gesamte Lichtstrahl durch den Substanzfleck gelenkt wird. Die Grösse der zu messenden DC-Flecken ist aber sehr unterschiedlich und die Spalthöhe kann nicht ständig angepasst werden. So kann man die idealen Bedingungen in der Praxis niemals erreichen. Folgende Zeichnung veranschaulicht dieses Problem:

Fig. 10

Die Problematik der Wahl der richtigen Spalthöhe

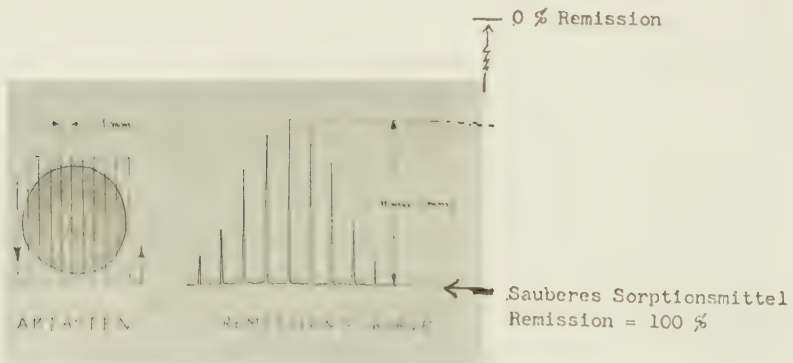


Aus diesem Grunde versuchten wir das Abtasten mit einer Lochblende von 1 mm Durchmesser gemäss Arbeiten von SEILER [5]. Die Schwierigkeit besteht darin, dass der Lichtstrahl, welcher auch auf der DC-Platte einen Lichtfleck mit 1 mm Durchmesser ergibt, exakt längs der Symmetrieachse des Flecks und parallel mit der Wanderungsrichtung geführt werden muss. Da die Chromatogramme aber meistens nicht ganz gerade laufen, müsste man die Symmetrieachse für jede Bahn bestimmen. Oder noch besser, man sollte den Fleck von mm zu mm abtasten, um die maximale Peakhöhe mit Sicherheit zu erfassen. Mit dem normalen Zeiss-Gerät wäre dies jedoch schwierig, denn man müsste die Platte nach jedem automatischen Lauf in der Y-Richtung um jeweils 1 mm von Hand in die X-Richtung verstellen.

Zwecks Automatisierung dieser Verschiebungen, haben wir bei der Fa. Carl Zeiss AG. Zürich (vormals Ganz-Optar AG.) eine Steuereinheit anfertigen lassen, die uns eine neuartige und bequeme Auswertung erlaubt. Mit Hilfe dieser Automatik kann jeder Substanzfleck mäanderförmig mit vorgewählten Schritten abgetastet werden. Die Verwendung von 1 mm Schritten zu der Lochblende von 1 mm erwies sich als günstig. Folgende Zeichnung veranschaulicht das mäanderförmige Abtasten und die dazugehörige Remissionskurve.

Fig. 7

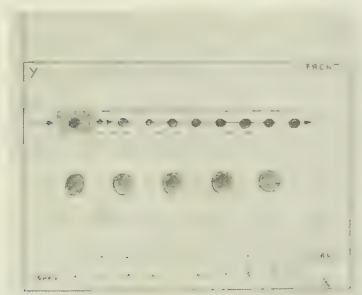
Schematische Darstellung einer neuartigen Methode: die mäanderförmige Abtastung des DC-Flecks (links) und die dazugehörige Remissions-Kurve (rechts)



Bei der Ausführung quantitativer Analysen tastet man in der Regel nicht die ganze Länge des Chromatogramms ab, sondern nur gerade diejenige Komponente (inkl. Vergleichswerte), welche man bestimmen möchte. Z.B:

Fig. 8

Mäanderförmige Abtastung einer DC-Platte



Vollständigkeitshalber soll erwähnt werden, dass es Autoren gibt wie KORTUM und VOGEL [6], JORK [7], welche eine andere, theoretisch besser begründete Auswertung verwenden. Diese verwenden die sogenannte Kubelka-Munk Funktion [8], welche die Zusammenhänge zwischen der Substanzkonzentration auf einem Adsorbens und der absoluten Remission beschreiben. Diese Funktion sieht in ihrer einfachsten Form wie folgt aus:

$$C = \frac{S}{E} \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2 R_{\infty}}$$

wobei C = Konzentration der Substanz

S = Streukoeffizient

E = Stoff-Konstante

R_{∞} = absolute Remission (R_{∞} Standard = 1)

Definitionsgemäss ist die Kubelka-Munk-Funktion unter folgenden Voraussetzungen erfüllt:

- die einfallende Strahlung ist diffus
- die Schichtdicke ist gegenüber der Wellenlänge unendlich gross
- die Substanz ist im Schichtmaterial homogen verteilt
- der Streukoeffizient ist von der Wellenlänge unabhängig.

Diese Bedingungen sind jedoch in der DC nur teilweise erfüllt. Dadurch bedingte Fehlernöglichkeiten können eliminiert werden, und zwar dadurch, dass man die Messungen mit Vergleichsflecken von bekannter Konzentration vergleicht, welche unter gleichen Bedingungen chromatographiert und gemessen werden. Die mit der Kubelka-Munk-Funktion erhaltene bessere Genauigkeit muss mit einem grösseren Arbeitsaufwand erkauft werden.

4.3.4 Fehlerquellen

a) Auftragen der Substanzlösungen

Auf den Startpunkten der DC-Platte werden kleine Volumina von 2, 3 oder 5 μl appliziert. Bei der visuellen Auswertung haben sich die kalibrierten, selbstfüllenden Wegwerfkapillaren, die s.g. MICROCAPS, sehr gut bewährt (Hersteller: Drummond Scientific Co., Broomall, PA, USA). Wir wollen gerne dieses praktische Hilfsmittel auch für die quantitativen Bestimmungen verwenden. Deshalb haben wir sie zuerst geeicht und die Messwerte statisch ausgewertet. Bei den 5 μl Kapillaren war die relative Standardabweichung $\pm 1\%$, unabhängig von der Art der geprüften Lösungsmittel (Methylenchlorid, Benzol, Dioxan, O-Dichlorbenzol).

Beschreibung der Eichmethode: Ein 5 μl -Microcap wurde wie üblich in einen Stahlhalter eingespannt, in eine 1 %ige 1-Isopropylaminoantrachinen-Lösung so wenig wie möglich eingetaucht und durch Kapillarwirkung gefüllt. Zum Lösen des stabilen Antrachinonderivates wurden 4 Lösungsmittel verschiedener Flüchtigkeiten verwendet: Methylenchlorid, Benzol, Dioxan und O-Dichlorbenzol. Der Inhalt der Microcaps wurde auf Kieselgel G Merck-Conicht aufre-

tragen, der Fleck mit dem Spatel ausgeschabt und in 10 ml-Messkolben transferiert. Anschliessend wurde er mit dem jeweils verwendeten Lösungsmittel zur Marke gestellt und die Extinktion mit einem Beckman DB-Spektralphotometer bei 502 nm Wellenlänge gemessen. Es wurden 1 cm-Glasküvetten verwendet und die Vergleichsküvette wurde mit dem jeweils verwendeten Lösungsmittel gefüllt.

Tab. 6

Bestimmung des Fehlanteils beim Arbeiten mit kalibrierten Kapillaren (Microcaps)

	Lösungsmittel	Anzahl Bestimmungen (N)	Mittelwert der Extinktion ($\bar{X}$)	Relative Standardabweichung (s_{rel})
Messungen mit jeweils neuen, aus verschiedenen Packungen stammenden Microcaps	Benzol	50	0.1467	$\pm 0.99 \%$
	Methylenchlorid	50	0.1397	$\pm 0.90 \%$
	Dioxan	50	0.1408	$\pm 0.97 \%$
	O-Dichlorbenzol	50	0.1387	$\pm 1.15 \%$
Messungen mit ein und derselben Microcap	Benzol	50	0.1456	± 1.0

Besprechung der Messwerte

- Die Unterschiede der relativen Standardabweichungen sind von Lösungsmittel zu Lösungsmittel bei einer statistischen Sicherheit von 95 % nicht signifikant.
- Auch die Verwendung von jeweils neuen oder ein und derselben Microcap hat praktisch keinen Einfluss auf die relative Standardabweichung.

b) Regelmässigkeit der Schichtdicke

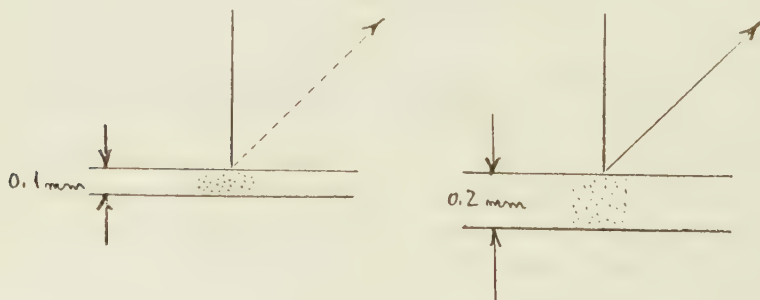
Zur quantitativen "in situ" Messung verwendeten wir ausschliesslich die regelmässigeren, von automatischen Streichgeräten stammenden DC-Platten. Bei einer Spalteinstellung von 0,250 mm erhält man nach der Trocknung im Falle von Kieselgel Schichten von ca. 0,170 mm Dicke. Solche Schichten können mit einem Trockenfilm-Dickenmesser mit einer von 0 - 1 mm reichenden Skala gemessen werden (z.B. Typ 233 der Fa. Erichsen, Hemer-Sundwig, Bundesrepublik Deutschland). * Die 20x20 cm Platten wurden stichprobenartig vor der Chromatographie an 25 gleichmässig verteilten Stellen gemessen. Fertigplatten der Fa. Merck (Art. Nr. 5715), mit automatischem Streichgerät der Fa. Camag (Muttenz, Schweiz) hergestellten Schichten, waren gleichwertig. Die relative Standardabweichung innerhalb einer Platte betrug ca $\pm 5\%$.

Welches ist der Einfluss der Schichtdicke auf die Genauigkeit der Remissionsmessungen?

Man stelle sich 2 Schichten von 0,1 bzw. 0,2 mm vor. Falls die gleiche Substanzmenge in beiden Fällen homogen verteilt wäre, müsste die 0,1 mm Schicht zweimal schwächer remittieren als die 0,2 mm:

Fig. 9

Problematik der Unregelmässigkeit der Schichtdicke



* vergl. Kapitel Präparative DC.

In Wirklichkeit ist aber die Substanz nicht homogen verteilt. Während des Wanderns entfernen sich die Flecken von der Glasplatte und reichern sich an der Schichtoberfläche an. SHELLARD [9] hat folgendes wahrscheinliches Verteilungsprofil vorgeschlagen:

Fig. 10

Schematische Darstellung der wahrscheinlichen Substanzverteilung in verschiedenen dicken Schichten nach SHELLARD [9]

Probable vertical profile



Die Remission wird nun von der Substanz, welche sich am oberflächlichen Schichtbereich befindet, beeinflusst und dürfte in den 3 Fällen unterschiedlich sein, sich jedoch in der gleichen Größenordnung bewegen. Die vorher gestellte Frage kann leider nicht genau beantwortet werden. Vorsichtshalber ist es empfehlenswert, möglichst regelmässige Platten zu verwenden.

c) Die Kammersättigung

Die Rolle der Kammersättigung mit Fliessmitteldämpfen ist bei Remissionsmessungen von grosser Wichtigkeit. Jork [10] hat schon vor Jahren darauf hingewiesen, dass in einer ungesättigten N-Kammer das Fliessmittel nicht nur nach oben wandert, sondern auch von der Glasunterlage gegen den Dampfraum. Die Ursache dieser sekundären Migration ist in der Fliessmittelverdunstung zu suchen. Deshalb befindet sich der Substanzfleck nicht in der ganzen Schichtdicke gleichmässig verteilt, sondern reichert sich an der Oberfläche an. Diese sekundäre Migration ist in den ungesättigten Trennkammern schlecht reproduzierbar. Sie kann jedoch durch sorgfältige Kammersättigung mit Filterpapiereinlage zurückgedrängt werden.

d) Aenderung der Peakhöhen

Wiederholt man das Abtasten eines Chromatogramms in gewissen zeitlichen Intervallen, so kann man öfters eine ständige Peakhöhe-Abnahme registrieren. Vermutlich ist diese Abnahme mit irgendeiner chemischen Aenderung der getrennten Substanz verbunden (evtl. Oxydation) oder mit der Aenderung der Schichtbeschaffenheit. Bei der Ausarbeitung von neuen Analysenverfahren muss man solche Phänomene in Betracht ziehen und gegebenenfalls das Abtasten der DC-Platten standardisieren. Z.B. muss das Abtasten jeweils nach 30 min Trocknung bei Raumtemperatur ausgeführt werden.

Beispiel

Bei der Bestimmung einer Nebenkompente (= ein Sulfid) in einem Sulfoxid (ungereinigtes Ronprodukt für die Gewinnung von Anturan[®]), pharmazeutische Wirksubstanz der CIBA-GEIGY AG., haben wir die Messungen nach 20 h wiederholt. Wir erhielten dabei durchschnittlich 24 % tiefere Peakhöhen für das Sulfid. Da aber die Eichung mit gleich alten Vergleichswerten erfolgte, blieb das prozentuale Ergebnis praktisch unverändert.

Tabellarischer Ueberblick:

Tab. 7

Aenderung der Messwerte nach 20 Stunden

	Peak-Höhe (mm)		Peak-Abnahme nach 20 Std		Sulfid %	
	10 min	20 Std		%	alt	neu
1. 200 µg = 1,0 % Sulfid	63	47	-16	-26	0,46	0,46
2. 0,6 µg = 0,3 % Sulfid	63	47	-16	-26	-	-
3. gleich wie 1.	63	47	-16	-24	0,46	0,46
4. 0,8 µg = 0,4 % Sulfid	63	47	-16	-26	-	-
5. gleich wie 1.	63	47	-16	-26	0,46	0,46
6. 1,0 µg = 0,5 % Sulfid	63	47	-16	-23	-	-
7. gleich wie 1.	63	47	-16	-27	0,46	0,46
8. 1,2 µg = 0,6 % Sulfid	63	47	-16	-23	-	-
9. gleich wie 1.	63	47	-16	-25	0,46	0,46
10. 1,4 µg = 0,7 % Sulfid	63	47	-16	-24	-	-

e) Der Einfluss des Fluoreszenzindikators

Die Anwendung von Fluoreszenzindikator enthaltenden Schichten ist gemäss Zeiss-Prospekt unerwünscht: "Wenn die Sorptionsmittelschicht selbst fluoresziert, wird die normale Absorptionsmessung in spektralen Bereichen gestört, in denen die Fluoreszenz des Sorptionsmittels angeregt wird". Die Verwendung eines Fluoreszenzindikators ist praktisch, denn sie erleichtert die Arbeit. Deshalb haben wir einige Versuche parallel auf fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Kieselgel-Fertigplatten ausgeführt (Merck Nr. 5715 bzw. Nr. 5721). Wir haben eine Substanz gewählt, welche ausgerechnet im "verbotenen" Wellenbereich (in welchem die Fluoreszenz angeregt wird) ihr Absorptionsmaximum hat: 4,4'-Dihydroxy-diphenyl-sulfon mit λ_{max} bei 255 nm. Wir haben zwischen den fluoreszierenden und nicht fluoreszierenden Schichten keinen signifikanten Unterschied gefunden und denken auch in Zukunft die fluoreszierenden Schichten vorsichtig zu verwenden.

f) Vom Instrument verursachte Fehler

Der vom Instrument verursachte Fehleranteil beträgt weniger als $\pm 0,7 \%$. Die wurde auf folgende Weise bestimmt: ein einziger, 1,25 μg starker UV-absorbierender Fleck wurde auf Kieselgelschicht (ohne Fluoreszenzindikator) aufgetragen, chromatographiert und dann 20-mal hintereinander gemessen.

$$N = 20$$

$$\bar{x} = 95,25 \text{ mm Peak-Höhe}$$

$$\text{Range} = 94-96,5 \text{ mm Peak-Höhe}$$

$$s_{\text{rel}} = \pm 0,7 \%$$

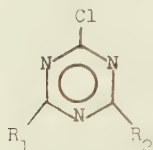
Der Fehler von 0,7 % schliesst auch den Ablesefehler mit dem Massstab ein.

Das Fremdlicht vermindert die Stabilität der Null- bzw. der 100 %-Linie. Durch Abdecken des Messkopfes, des Empfängers und des Kreutzisches mit einem schwarzen Tuch konnte eine wesentlich stabilere Null-Linie erreicht werden.

4.3.5 Praktische Beispiele

a) Bestimmung der NebenkompONENTEN in einem technischen Produkt (= Atrazin^(R))

Problemstellung: Die mengenmässig wichtigsten NebenkompONENTEN von Atrazin sind Simazin^(R) und Propazin^(R):



	R 1	R 2
Atrazin	$-C_2H_5$	$-CH(CH_3)_2$
Simazin	$-C_2H_5$	$-C_2H_5$
Propazin	$-CH(CH_3)_2$	$-CH(CH_3)_2$

Normalerweise genügt die semiquantitative visuelle Auswertung, aber in speziellen Fällen sind bessere Genauigkeiten erwünscht. Dafür eignet sich die "in situ" Methode. In so einem Fall haben wir folgende Resultate erhalten:

Tab. 8

Zusammenstellung der Messwerte

	Simazin	Propazin
Anzahl Bestimmungen (N)	10	10
Mittelwert ($\bar{x}$)	1,8 %	1,4 %
Range	1,6-1,9 %	1,2-2,5 %
Relative Standardabweichung (s_{rel})	4,5 %	4,0 %

Beschreibung der Methode:

Trenntechnik:

aufsteigend, auf 20x20 cm Platten, in
Desaga-N-Kammer

Schicht:

Fertigplatte Kieselgel Merck ohne Fluoreszenzindikator (Nr. 5721)

Fließmittel: Cyclohexan-Essigester (70+30)
 Sättigung: 1 h, mit Filterpapierauskleidung
 Aufgetragen: 5 µl 0,5 %ige Lösung in Aceton (= 25 µg)
 Lichtquelle: Deuteriumlampe H30 DX
 Wellenlänge: 230 nm
 Spalt des Monochromators: 0,80 mm
 Blende: 1 mm Lochblende
 Papiervorschub: 40 sek/inch
 Kreuztischvorschub: 30 cm/min
 Abtasten: mäanderförmig, mit 1 mm Schritten
 Auswertung: graphisch (Peakhöhe gegenüber Konzentration)

Tab. 9

Einteilung der DC-Platte:

Bahn 1 =	Vergleichsmenge (= 1,5 % Simazin)
2 =	Probe
3 =	Vergleichsmenge (= 2,0 % Simazin)
4 =	Probe
5 =	Vergleichsmenge (= 1,5 % Simazin)
6 =	Probe
7 =	Vergleichsmenge (= 2,0 % Simazin)
8 =	Probe
9 =	Vergleichsmenge (= 1,5 % Simazin)

Im Falle von Propazin wurde 2,0 bzw. 3,0 % aufgetragen.

Ueberprüfung der Methode auf systematische Fehler

Die relative Standardabweichung dieser Methode war befriedigend ($s_{rel} < 5\%$),
 aber diese Grösse charakterisiert lediglich die Reproduzierbarkeit einer
 Methode und sagt nichts über die Richtigkeit der Analysenwerte aus. **Ent-**
hält zB. irgend eine Methode systematische Fehler, so kann sie zwar zu gut
 reproduzierbaren, aber trotzdem falschen Werten führen. Die evtl. Anwesen-

heit solcher systematischer Fehler prüft man am besten, indem eine Probe analysiert wird, deren "wahrer Wert" irgendwoner bekannt ist. Im konkreten Fall von Atrazin sind wir in der glücklichen Lage gewesen, die in Frage kommenden Verbindungen in reinster Form zu besitzen. Durch exakte Einwaage von Reinsubstanzen mittels Analysenwaage konnten wir den wahren Wert einer synthetisch zusammengesetzten Probe zum voraus bestimmen:

Einwaage: 957,6 mg Atrazin reinst

24,5 mg Propazin "

17,9 mg Simazin "

1000,0 mg Gemisch mit 1,79 % Simazin- und 2,45 % Propazin-Gehalt

Die quantitative "in situ" Messung ergab folgende Resultate:

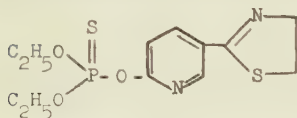
Tab. 10

Zusammensetzung der Messwerte

		Simazin	Propazin
Anzahl Bestimmungen	(N)	20	20
Mittelwert	($\bar{x}$)	1,77 %	2,19 %
Range		1,63-1,90 %	2,05-2,35 %
Relative Standardabweichung (s_{rel})		$\pm 5,0$ %	$\pm 4,2$ %

Die Abweichungen befinden sich innerhalb der Fehlergrenzen und anhand dieser Übereinstimmung darf man annehmen, dass die Methode keine systematischen Fehler aufweist.

b) Bestimmung der Hauptkomponente in einem Forschungspräparat GS 25087



Problemstellung: Das Forschungspräparat GS 25087 war auf seine Hitzebeständigkeit geprüft worden. Mit Hilfe der qualitativen DC stellte man fest, dass bei Temperaturen von 65- und 100°C gelagerte Proben merkbare Zersetzungen erlitten. Der genaue Grad der Zersetzung wurde anschliessend durch die Bestimmung des nicht zersetzten Wirksubstanz-Anteiles festgestellt.

Tab. 11

Zusammenfassung der Messwerte

	Muster 1 2 Wochen bei 20°C	Muster 2 2 Wochen bei 65°C	Muster 3 1 Tag bei 100°C
Anzahl Bestimmungen (N)	15	15	5
Gehalt der Hauptkomp. ($\bar{x}$)	97,6 %	71,6 %	9,3 %
Range	95-102 %	63-77 %	9,2-9,5 %
Relative Standardabw. (s_{rel})	3 %	5,2 %	2 %

Beschreibung der Methode

Trenntechnik:	aufsteigend, auf 20x20 cm Platten, in Desaga-N-Trennkammer
Schicht:	Fertigplatte Kieselgel Merck ohne Fluoreszenz-indikator (Nr. 5721)
Fliessmittel:	Benzol-Aceton (85+10)
Sättigung:	1 h mit Filterpapier-Auskleidung
Aufgetragen:	5 µl 0,1 %ige Lösung (= 5 µg)
Lichtquelle:	Deuteriumlampe H 30 DS
Wellenlänge:	240 nm
Spalt des Monochromators:	0,80 nm
Blende:	1 mm Lochblende

Papiervorschub: 40 s/inch
Kreuztischvorschub: 30 cm/min
Abtasten: mÄanderförmig, mit 1 mm Schritten
Auswertung: graphisch (Peakhöhe gegenüber Konzentration)

Tab. 12

Einteilung der DC-Platte

Bahn 1 =	Vergleichsmenge (tiefer als erwartet)
2 =	Probe
3 =	Vergleichsmenge (höher als erwartet)
4 =	Probe
5 =	Vergleichsmenge (tiefer als erwartet)
6 =	Probe
7 =	Vergleichsmenge (höher als erwartet)
8 =	Probe
9 =	Vergleichsmenge (tiefer als erwartet)

c) Bestimmung des 1-Aminoantrachinon-Anteiles in Reaktionsgemischen

Problemstellung

Bei der Nitrierung und nachfolgenden Reduktion von Antrachinon entstehen in der Regel Isomere und Homologe. In Zusammenhang mit der Optimierung der Reaktionsbedingungen, welche zu möglichst hohenprozentigen 1-Aminoantrachinon führen soll, haben wir eine quantitative Methode zur Bestimmung der erwünschten Verbindung ausgearbeitet.

Tab. 13

Aminoantrachinon, Zusammenfassung der Messwerte

Bezeichnung der Probe	Anzahl Bestimmungen (N)	Gehalt an 1-Amino- antrachinon ($\bar{x}$)	Relative Standard- abweichung (s_{rel})
1	5	89,5 %	$\pm 1,3 \%$
2	"	69,4	3,0
3	"	92,3	2,2
4	"	65,9	4,6
5	"	85,5	3,5
6	"	51,4	5,6
7	"	68,3	3,0
8	"	46,1	3,0
9	"	52,4	5,2
10	"	58,0	2,7
11	"	51,8	4,9
12	"	57,3	2,6
13	"	56,0	2,2
14	"	52,6	2,6
15	"	54,0	1,3
16	"	57,2	2,3
17	"	54,6	3,2
18	"	55,4	3,6
19	"	41,4	4,9
20	"	52,8	2,2
21	"	53,4	3,7
22	"	56,7	2,8
23	"	48,0	3,2
24	"	59,2	3,3
25	"	75,6	2,3
26	"	93,9	1,8

Beschreibung der Methode

Trenntechnik:	aufsteigend, auf 20x20 cm Platte, in Camag-N-Kammer
Schicht:	Fertigplatte Kieselgel Merck mit Fluoreszenz-indikator (Art. Nr. 5715)
Fliessmittel:	Toluol-Eisessig (70+30)
Sättigung:	1 h, mit Filterpapier-Auskleidung
Aufgetragen:	2 µl 0,05 %ige frische Lösung aus Dioxan (= 1 µg)
Rf-Werte:	1,4-Diaminoantrachinon 0,34
	2-Aminoantrachinon 0,39
	1,5-Diaminoantrachinon } 0,45
	1,8-Diaminoantrachinon } 0,45
	1,2-Dihydroxyantrachinon } 0,45
	1-Aminoantrachinon 0,51
	1-Hydroxyantrachinon } 0,58
	1,4-Dihydroxyantrachinon } 0,58
	1,5-Dihydroxyantrachinon } 0,58
	1,8-Dihydroxyantrachinon } 0,58
Lichtquelle:	Deuteriumlampe H 30 DS
Wellenlänge:	480 nm
Spalt des Monochromators:	0,1 mm
Blende:	1 mm Lochblende
Papiervorschub:	40 s/inch
Kreuztischvorschub:	30 cm/min
Abtasten:	mäanderförmig, mit 1 mm Schritten
Auswertung:	graphisch (Peakhöhe gegenüber Konzentration)

Tab. 14

Einteilung der DC-Platte

Bahn 1	Vergleichsmenge (40 % 1-Aminoantrachinon)
2	Probe 15
3	Vergleichsmenge (50 % 1-Aminoantrachinon)
4	Probe 15
5	Vergleichsmenge (40 % 1-Aminoantrachinon)
6	Probe 15
7	Vergleichsmenge (50 % 1-Aminoantrachinon)
8	Probe 15
9	Vergleichsmenge (40 % 1-Aminoantrachinon)

4.4. Die direkte "in situ" Auswertung von Dünnschichtchromatogrammen mittels Fluoreszenzmessungen

4.4.1 Prinzip der Fluoreszenzmessungen

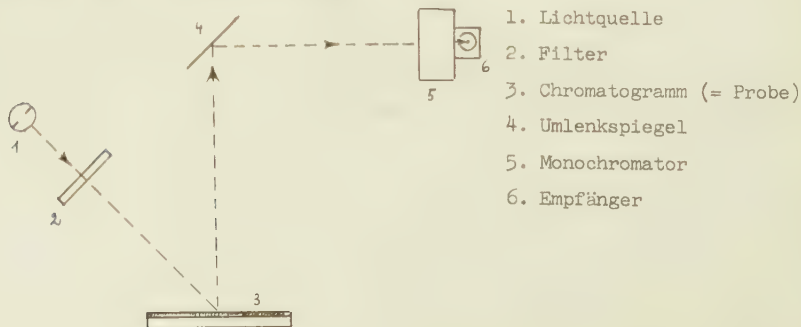
Die Strahlung einer geeigneten Lichtquelle (Quecksilber-, Wolfram- oder Deuterium-Lampe) trifft auf den fluoreszierenden DC-Fleck. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird zusammen mit dem remittierten Erregerlicht in einen Monochromator geleitet und spektral zerlegt. Am Monochromator wird diejenige Wellenlänge eingestellt, welche z.B. dem Emissions-Maximum der fluoreszierenden Substanz entspricht. Das Fluoreszenzlicht gelangt auf einen lichtelektrischen Empfänger (Sekundär-Elektronenvervielfacher). Das Signal des Empfängers wird entsprechend verstärkt und von einem Kompensationsschreiber kontinuierlich registriert. Die DC-Platte wird kontinuierlich an der Messfläche vorbeigeführt, so dass als Messergebnis für jeden DC-Fleck je eine Glockenkurve entsteht. Die Fläche oder die maximale Höhe der Kurve ist ein Mass für die Substanzmenge aus dem DC-Fleck. Die Methode ist relativ und die quantitative Auswertung wird mittels Vergleichsflecken bekannter Konzentration ausgeführt. Als Standard eignen sich am besten diejenigen Substanzen, welche gerade gemessen werden.

4.4.2 Besprechung der angewendeten Mess- und Auswertverfahren

Die Messung fluoreszierender DC-Flecken erfolgte mit dem Zeiss-Chromatogramm Spektralphotometer nach der Pr-M Anordnung:

Fig 11

Schematische Darstellung des Zeiss-Chromatogramm Spektralphotometer. Anordnung für Fluoreszenzmessung



Als Lichtquelle zur Anregung der DC-Flecken dient eine Mitteldruck-Quecksilberlampe (St 41). Zwischen Lichtquelle und Probe wurde der Monochromatfilter M 365 eingeschoben, welcher die unerwünschten Spektralbereiche durch Absorption zurückhält und nur die um 365 nm liegenden Spektralbereiche durchlässt. Am Monochromator (Prismenmonochromator M4Q III) wird diejenige Wellenlänge eingestellt, welche der Fluoreszenzfarbe des DC-Fleckes entspricht. Die Automatik wurde auf "Spur" eingestellt, und der Schrittmotor schaltete automatisch in X-Richtung von Bahn zu Bahn. Zur quantitativen Auswertung wurde die allereinfachste empirische Beziehung verwendet, und zwar diejenige zwischen maximaler Peak-Höhe und Konzentration. Die zu analysierenden Proben wurden jeweils beidseitig mit Vergleichswerten bekannter Konzentration flankiert: die eine mit geringerer, die andere mit höherer Konzentration als erwartet. Die Auswertung erfolgte graphisch durch lineare Interpolation.

Die Fluoreszenzmethode ist 1-2 Zehnerpotenzen empfindlicher als die UV-VIS-Remissionsmethode. Die chromatographische Schicht selbst fluoresziert praktisch nicht, deshalb kann man mit hoher Verstärkung und mit relativ breitem Spalt arbeiten. Die Genauigkeit ist mit derjenigen der Remissionsmethode vergleichbar und hat sogar den Vorteil, weniger von Fleckenform und dessen Homogenität abhängig zu sein. Mit anderen Worten, auch qualitativ schlechtere Chromatogramme, mit leicht deformierten Flecken, haben eine Chance bei der Fluoreszenz-Methode. Um diese Vorteile ausnützen zu können sollte man wenn möglich die Fluoreszenz-Methode anwenden.

4.4.3 Anwendungsbeispiele

a) Bestimmung von Acridin und 7-Methylacridin in 10-Methoxyiminostilben

Problemstellung: Acridin und 7-Methylacridin sind theoretischen mögliche Begleitstoffe von 10-Methoxyiminostilben. Allerdings kommen sie selten vor und auch dann nur in Spuren. Wir haben trotzdem dieses Beispiel gewählt, weil die beiden Acridin-Verbindungen intensiv fluoreszieren, chemisch beständig sind und sich deshalb gut zum Testen der Fluoreszenz-Anordnung des Zeiss-Gerätes eignen.

Chromatographische Bedingungen

Trenntechnik A:	aufsteigend, in N-Kammer, mit Filterpapier-Einlage
Trenntechnik B:	horizontal, in Camag-Vario-KS-Kammer, gleichmässige Bedampfung der Schicht mit dem Fliessmittel
Sorptionsmittel:	Kieselgel GF Woelm
Beschichtung:	mit dem Camag Automat, 0,30 mm Spalteinstellung
Trocknung:	über Nacht, bei Raumtemperatur und 50-60 % rel. Luftfeuchtigkeit
Fliessmittel:	Tetrachlorkohlenstoff-Chloroform-Essigester (70+15+15)
Lösungen:	vergl. 3.1.3
Aufgetragen:	Je 5 µl mit Drummond Microcaps
Vorsichtsmassnahmen:	a) jeweils frisch hergestellte Lösungen auftragen b) Trennkammer während der Chromatographie mit schwarzer Haube überdecken.

Mess-Bedingungen

Geräteanordnung:	Pr-M (Probe-Monochromator)
Lichtquelle:	Quecksilber-Lampe
Filter:	Monochromat M 365
Mess-Wellenlänge:	480 nm
Blende:	Irisblende
Spalt:	0,15 mm
Papiervorschub:	20 s/inch
Kreuztischvorschub:	Geschwindigkeit 2 (= 15 cm/min)
Verstärkung:	S.1.II.A
Abtasten:	mittels Automatik
	Einstellung: Spur, 15,2 mm.

Einteilung der DC-Platten

Serie A je 0,20 µg Acridin oder 9-Methylacridin allein
9 Startpunkte pro 20x20 cm Platte
Seitlicher Abstand zwischen den Auftropfungen = 15 mm

Serie B je 0,20 µg Acridin + 9-Methylacridin (Gemisch)

Serie C Probe flankiert mit Referenzen.

Bahn 1 Referenz (je 0,15 µg Acridin + 9-Methylacridin)
2 Probe (100 µg mit je 0,20 % Nebenkompente)
3 Referenz (je 0,25 µg Acridin + 9-Methylacridin)
4 Probe (100 µg mit je 0,20 % Nebenkompente)
5 Referenz (je 0,15 µg Acridin + 9-Methylacridin)
6 Probe (100 µg mit je 0,20 % Nebenkompente)
7 Referenz (je 0,25 µg Acridin + 9-Methylacridin)
8 Probe (100 µg mit je 0,20 % Nebenkompente)
9 Referenz (je 0,15 µg Acridin + 9-Methylacridin)

Fig. 12

Foto der DC-Platte im UV₂₅₄

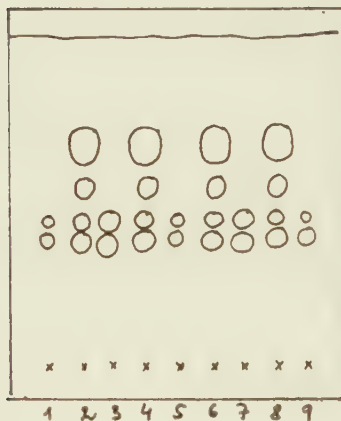


Fig. 13

Foto der DC-Platte im UV₃₅₀



Messwerte der Serie A mit je 0,20 ug Acridin

Platte Nr.	Trenntechnik	Anzahl Messwerte pro Platte(n)	max. Peak-Höhe mm ($\bar{x}$)	rel. Standard- abweichung
1	Vario-K3	"	90,0	$\pm 1,0$
2	"	"	71,1	2,5
3	"	"	68,3	0,7
4	"	"	90,0	1,8
5	N-Kammer	"	77,4	4,0
6	"	"	81,1	1,2
7	"	"	77,0	2,5
8	"	"	70,3	2,6

Tab. 16

Messwerte der Serie A mit je 0,20 µg 9-Methylacridin

Platte Nr.	Trenntechnik	Anzahl Messwerte pro Platte (n)	max. Peak-Höhe mm ($\bar{x}$)	rel. Standardabweichung
9	Vario-KS	9	134,3	$\pm 1,3 \%$
10	"	"	100,5	2,5
11	"	"	106,9	2,5
12	"	"	131,9	1,5
13	N-Kammer	"	143,1	2,0
14	"	"	159,1	1,6
15	"	"	168,1	1,9
16	"	"	165,4	1,8

Tab. 17

Messwerte der Serie B mit je 0,20 µg Acridin + 9-Methylacridin

Platte Nr.	Trenntechn.	Anz. Messw. pro Pl. (n)	Peak-Höhe in mm ($\bar{x}$)		rel. Standardabweichung	
			Acridin	9-Methylacr.	Acridin	9-Methylacridin
17	Vario-KS	9	67,6	127,1	$\pm 1,0 \%$	$\pm 1,5 \%$
18	"	"	63,6	115,4	2,2	1,0
19	"	"	70,3	131,4	3,3	1,0
20	"	"	70,1	136,3	1,0	1,5
21	N-Kammer	"	82,3	170,9	2,2	1,2
22	"	"	35,7	121,7	3,2	2,5
23	"	"	81,8	160,4	1,8	1,7
24	"	"	77,4	155,1	1,1	1,0

Tab. 18

Messwerte der Serie C (10-Methoxyiminostilben mit synth. Zugabe von ca. je 0,2 % Acridin und 9-Methylacridin)

DC-Platte Nr.	Trenntechnik	Anzahl Messwerte pro Platte(n)	Acridin		9-Methylacridin	
			% Gehalt ($\bar{x}$)	s _{rel}	% Gehalt ($\bar{x}$)	s _{rel}
25	Vario-KS	4	0,189	1,32%	0,185	+1,1%
26	"	"	0,186	1,2	0,186	1,6
27	"	"	0,183	1,9	0,184	2,2
28	"	"	0,190	2,2	0,191	2,5
29	"	"	0,190	1,7	0,189	1,6
30	"	"	0,190	2,1	0,190	2,4
31	"	"	0,183	1,1	0,184	0,8
32	"	"	0,183	0,7	0,180	0,9
33	"	"	0,187	1,7	0,189	2,1
34	"	"	0,181	1,4	0,184	1,9
35	"	"	0,185	2,4	0,184	1,7
36	"	"	0,183	2,1	0,183	3,1
37	N-Kammer	"	0,191	0,8	0,184	0,7
38	"	"	0,183	1,5	0,181	1,2
39	"	"	0,184	1,9	0,178	0,5
40	"	"	0,194	1,7	0,183	2,1
41	"	"	0,192	2,5	0,176	2,2
42	"	"	0,189	0,7	0,176	1,8
43	"	"	0,190	2,5	0,174	1,8
44	"	"	0,191	1,6	0,175	2,2
45	"	"	0,190	1,4	0,172	1,5
46	"	"	0,197	2,2	0,175	2,7
47	"	"	0,192	0,7	0,172	1,9
48	"	"	0,190	1,1	0,172	1,3

Tab. 19

Vergleich der mit den 2 verschiedenen Kammertypen erzielten Messwerte

	Acridin		9-Methylacridin	
	Vario-KS	N-Kammer	Vario-KS	N-Kammer
Anzahl Bestimmungen (n)	48	48	48	48
Gehalt ($\bar{x}$)	0,186 ‰	0,191 ‰	0,186 ‰	0,176 ‰
rel. Standardabweichung	$\pm 2,4$ ‰	$\pm 1,8$ ‰	$\pm 2,5$ ‰	$\pm 2,7$ ‰

Konklusion: keine signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kammertypen.

Als Beispiel enthalten die nächsten 3 Seiten:

- Densitogramm der Platte Nr. 20
- Densitogramm der Platte Nr. 36
- Eichkurve (Peakhöhe in Funktion der Konzentration).

FIG. 14

PLATTE NR. 20

mit je 0.20 µg

ACRIDIN + 9-METHYLACRIDIN

(8 - BAHNEN)

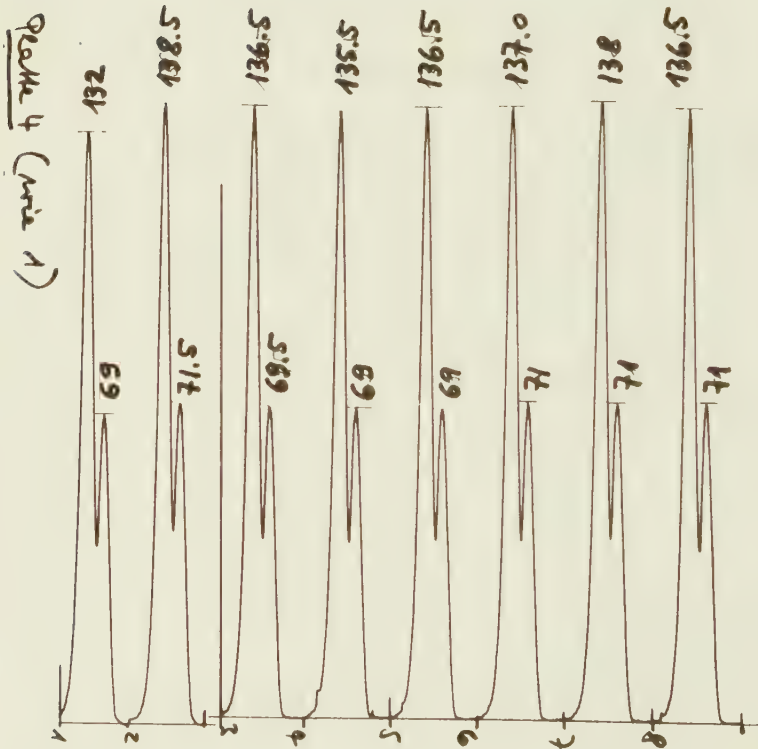
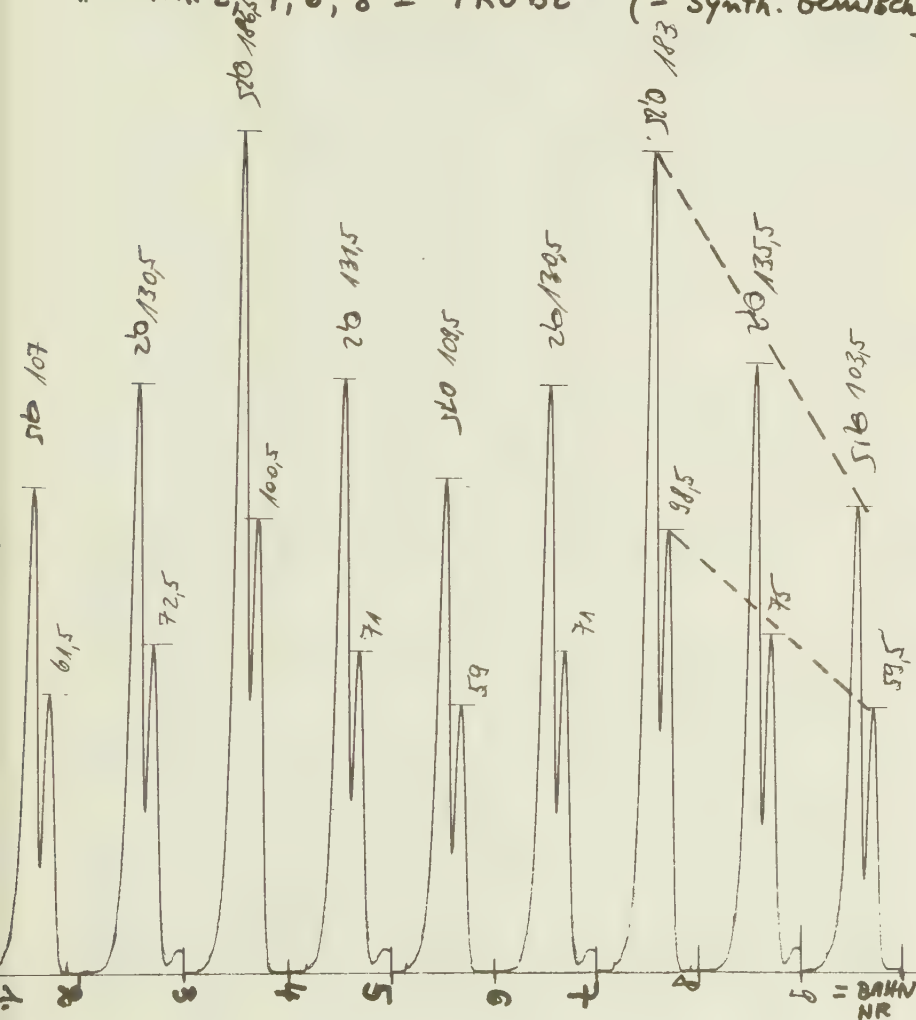


FIG. 15

PLATTE NR. 36

- 111 -

BAHN NR. 1, 5, 9 = je 0.15 µg ACR. + 9-METHYL.
 " NR. 3, 7 = je 0.25 " " + "
 " NR. 2, 4, 6, 8 = "PROBE" (= Synth. Gemisch)



PEAK HÖHE (mm)

9-METHYLACRIDIN

250

150

100

50

0

0,5

1,0

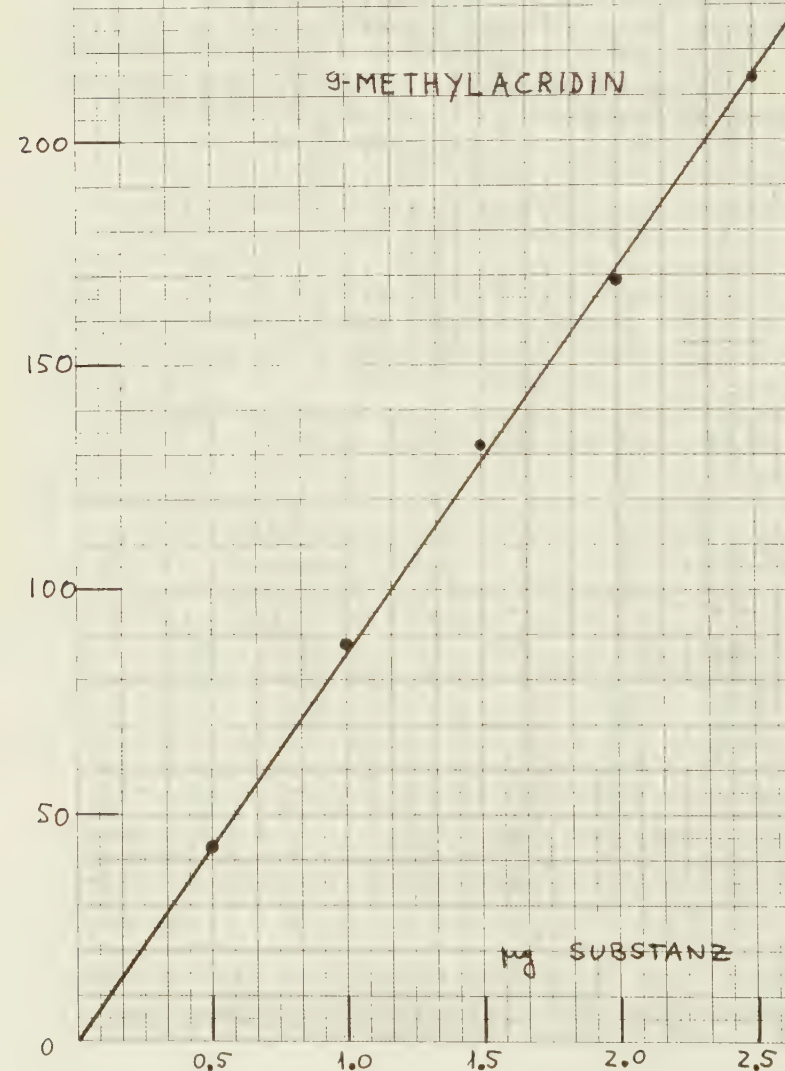
1,5

2,0

2,5

µg SUBSTANZ

FABRICATION SUISSE



Besprechung der Resultate

- Die Beziehung zwischen Peakhöhe und Konzentration ist im Bereich zwischen 0,05-2,5 µg linear (vergl. Eichwerte von 9-Methylacridin). Der darauf folgende Bereich von 2,5-5,0 µg ist nicht mehr linear, aber steil genug, um Auswertungen aufzuführen (= dynamischer Bereich).
- Künstlich zugefügte Mengen von ca. 0,2 % Acridin bzw. 9-Methylacridin konnten wieder gefunden werden. Die relative Standardabweichung lag unter 3 % und ist vergleichbar mit den besten Remissionswerten.
- Die Empfindlichkeit der Fluoreszenzmethode ist gut 1 Zehnerpotenz besser als diejenige der Remissionsverfahren. Als Beispiel sei erwähnt, dass 0,2 µg Acridin bzw. 9-Methylacridin bei nicht voll ausgeschöpfter Verstärkung Peakhöhen von 70-100 mm zeigten.
- Es wurden Parallelversuche mit 2 Kammertypen ausgeführt (Vario-KS bzw. N-Kammer), mit der Absicht, die erwartete Ueberlegenheit der Vario-KS Kammer zu bestätigen. In diesen konkreten Versuchen konnten wir keine signifikanten Unterschiede finden (vergl. Tab. 19). Die statistischen Prüfungen (F- und t-Test) wurden bei einer Sicherheitsschranke von P = 95 % ausgeführt.

b) Bestimmung der fluoreszierenden NebenkompONENTEN von einer Stilben-Verbindung

Problemstellung: 4,4'-Bis- $\left[2\text{-Morpholino-4-anilino-1,3,5-triazin-2-ylamino}\right]$ -stilben-2,2'-disulfonsäure kann kleine Mengen folgender NebenkompONENTen enthalten:

- NK 1 = Tetramorpholino-Derivat
- NK 2 = Trimorpholino-monoanilino-Derivat
- NK 3 = Trianilino-monomorpholino-Derivat
- NK 4 = Tetraanilino-Derivat

Für nachfolgende Untersuchungen haben wir ein synthetischen Gemisch mit je ca. 0,4 % NebenkompONENTen hergestellt.

Chromatographische Bedingungen

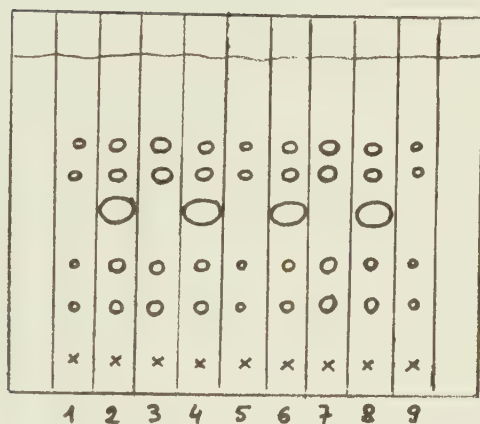
Trenntechnik:	aufsteigend, in N-Kammer, mit Filterpapier-Einlage
Sorptionsmittel:	Kieselgel G. Merck
Beschichtung:	mit dem Camag-Automat, 0,30 mm Spalteinstellung
Trocknung:	45 min bei 110°C
Fliessmittel:	Aceton-Benzol-10,3 Diaethanolamin in Wasser (87,5+25+12,5)
Aufgetragene Menge:	10 µg Produkt (= 2 µl 0,5 %ige Lösung in Aceton-Wasser = 9+1). Bei Bedarf kann man bis 30 µg Produkt gut trennen
Vorsichtsmassnahmen:	Diese Stilben-Verbindungen sind in verdünnter Lösung lichtempfindlich. Deshalb haben wir die Lösungen unter Ausschluss von Tageslicht hergestellt. Am zweckmässigsten arbeitet man in einer Dunkelkammer, in welcher die Lichtröhren mit UV-Absorber enthaltenden Kunststoff-Kassetten überdeckt sind. Das Auftragen der Lösungen, die Chromatographie und auch die Trocknung der Chromatogramme sollen in der erwähnten Dunkelkammer ausgeführt werden. Zur Entfernung der Fliessmittelreste wurden die Platten im Vakuum-Trockenschrank 2 h bei 95°C und ca. 100 mm Hg getrocknet. Anschliessend wurden die Chromatogramme 15 min in einem Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und gemessen.

Mess-Bedingungen

Geräteeinrichtung:	Pr-M (Probe-Monochromator)
Lichtquelle:	Quecksilberlampe
Filter:	Monochromat M 365
Mess-Wellenlänge:	440 nm
Blende:	Irisblende
Spalt:	0,15 mm
Papiervorschub:	20 s/inch
Kreuztischvorschub:	Geschwindigkeit 2 = 15 cm/min
Verstärkung:	6.10.II.A
Abtasten:	mittels Automatik, Spur = 15,2 mm

Fig. 17

Foto der DC-Platte im UV₃₅₀



Tab. 20

Einteilung der DC-Platte

Bahn 1	Referenz (je 0,15 µg NK 1-4 = je 0,3 %)
2	Probe (50 µg)
3	Referenz (je 0,25 µg NK 1-4 = je 0,5 %)
4	Probe (50 µg)
5	Referenz (je 0,15 µg NK 1-4 = je 0,3 %)
6	Probe (50 µg)
7	Referenz (je 0,25 µg NK 1-4 = je 0,5 %)
8	Probe (50 µg)
9	Referenz (je 0,15 µg NK 1-4 = je 0,3 %)

Zur Abklärung der Empfindlichkeit und des Linearitätsbereiches wurden Eichreihen aller 4 Nebenkomponten chromatographiert und gemessen (zwischen je 0,010-0,40 µg).

Tab. 21

Zusammenfassung der Messwerte mit normal getrockneten DC-Platten

		NK 1	NK 2	NK 3	NK 4
Platte 14	n	4	4	4	4
	$\bar{x}$	0,46	0,51	0,46	0,43
	$s_{rel} (\%)$	6,5	14,0	10,7	7,2
Platte 15	n	4	4	4	4
	$\bar{x}$	0,40	0,38	0,43	0,42
	$s_{rel} (\%)$	8,0	12,4	10,0	6,2
Platte 16	n	4	4	4	4
	$\bar{x}$	0,37	0,37	0,42	0,41
	$s_{rel} (\%)$	10,0	9,8	11,3	10,0
Platte 17	n	4	4	4	4
	$\bar{x}$	0,36	0,38	0,44	0,40
	$s_{rel} (\%)$	13,0	11,0	6,7	10,0

Besprechung der Messwerte

Die ersten Platten (Nr. 14-17), welche noch nicht im Vakuum getrocknet wurden, haben ziemlich schlecht reproduzierbare Messwerte ergeben (ca. 10 % relative Standardabweichung).

Anschliessend haben wir festgestellt, dass die Peakhöhen nach jeder weiteren Messung stets kleiner wurden. Ohne Zweifel ist die wiederholte UV-Belichtung daran schuld. Wir erinnerten uns, dass Stilbenverbindungen in Gegenwart von Lösungsmitteln empfindlicher sind als in trockenem Zustand und versuchten deshalb die Lösungsmittelreste nach folgenden 3 Arten möglichst vollständig zu entfernen:

- in normal ventiliertem Trockenschrank (2 h bei 110°C)
- in Trockenschrank mit erhöhter Luftzirkulation (2 h bei 110°C)
- in Vakuumtrockenschrank (2 h bei 95°C und ca. 100 mm Hg).

Von allen 3 Varianten haben die Vakuum-getrockneten Platten (nach wiederholter Belichtung) die langsamste Peak-Abnahme gezeigt und auch die damit erzielten relativen Standardabweichungen wurden verbessert:

Tab. 22

Zusammenfassung der Messwerte mit Vakuum-getrockneten DC-Platten

	NK 1	NK 2	NK 3	NK 4
Platte 22 n	4	4	4	4
$\bar{x}$	0,39	0,36	0,40	0,39
s_{rel}	1,8	3,1	2,3	4,0
Platte 23 n	4	4	4	4
$\bar{x}$	0,41	0,37	0,43	0,41
s_{rel}	5,8	3,0	2,8	3,7
Platte 24 n	4	4	4	4
$\bar{x}$	0,41	0,37	0,44	0,42
s_{rel}	7,1	5,1	1,9	5,0
Platte 25 n	4	4	4	4
$\bar{x}$	0,38	0,38	0,40	0,37
s_{rel}	6,3	6,9	5,0	4,1

Zur weiteren Verbesserung der Ergebnisse haben wir nebst der Chromatographie in der N-Kammer auch die Camag Vario-KS-Kammer geprüft. In diesem konkreten Fall hat jedoch die Vario-KS-Kammer keine Vorteile gezeigt.

o) Bestimmung von fluoreszierenden Stilben-Verbindungen in Extrakten

Problemstellung: In der letzten Zeit wurden einige interne analytische Methoden zur Bestimmung von optischen Aufhellern in Wasser, Abwasser und Schlamm ausgearbeitet. Z.Z. erfolgt die Endbestimmung mittels semiquantitativer Dünnschichtchromatographie. Wir haben nun untersucht, inwieweit die visuelle Schätzung mit der genaueren densitometrischen Messung zu ersetzen wäre. Die weiter unten beschriebenen Versuche sind als Vorversuche zu betrachten, da wir nicht mit Extrakten, sondern nur mit selbsthergestellten Test-Lösungen operieren.

Chromatographische Bedingungen

Trenntechnik:	aufsteigend, in N-Kammer, mit Filterpapier-Einlage
Sorptionsmittel:	Kieselgel GF Woelm DC (Art. Nr. 213)
Beschichtung:	mit dem Camag-Automat, 0,30 mm Spalteinstellung
Trocknung:	45 min bei 110°C
Fliessmittel:	OA I, Essigester-Pyridin-Wasser (70+25+20) OA III, n-Butanol-konz-Ammoniak (85+15) OA VII, n-Propanol-Aceton-konz-Ammoniak-Wasser (70+10+20+10) OA IX, Aceton-Benzol-Wasser-konz-Ammoniak (70+20+7+4) mit Zusatz von 2 vol % Tetrabutylammonium-jodid p.a. OA XI, Aceton-Benzol-10 % Diaethanolamin in Wasser (87,5+25+12,5)
Aufgetragene Mengen:	Je 0,2 µg fluoreszierende Verbindung (= 2 µl 0,01 %ige Lösung in Aceton-Wasser = 9+1)
Vorsichtsmassnahmen:	gleich wie in Abschnitt 3.2.2.

Mess-Bedingungen

Gleich wie Abschnitt 3.2.3

Einteilung der DC-Platten

Pro 20x20 cm Platte wurde der gleiche optische Aufheller jeweils 8 mal aufgetragen (je 0,2 µg)

Besprechung der Messwerte

A. Zwei fluoreszierende Verbindungen chromatographiert mit fünf verschiedenen Fließmitteln

Zuerst haben wir 2 fluoreszierende Verbindungen (Nr. 1 und 2) mit den Fließmitteln Nr. I, III, IX und XI chromatographiert.

Tab. 23

Messwerte nach 5 verschiedenen Fließmitteln

Fluores- zierende Verbindg.	Fließmittel									
	I		III		VII		IX		XI	
	$\bar{x}$	s_{rel}	$\bar{x}$	s_{rel}	$\bar{x}$	s_{rel}	$\bar{x}$	s_{rel}	$\bar{x}$	s_{rel}
Nr. 1	73,2	7,7	107,4	3,7	97,8	20,0	142	35,0	75,0	8,6
Nr. 2	103,2	5,1	117,7	2,1	86,6	4,0	204,7	7,4	95	16

Nr. 1 = 4,4'-Bis- β -(3-Methoxy-propylamino)-4-anilino-1,3,5-triazin-6-ylamino-7-stilben-2,2'-disulfonsäure.

Nr. 2 = 4,4'-Bis- β -Morpholino-4-anilino-1,3,5-triazin-6-ylamino-7-stilben-2,2'-disulfonsäure.

$\bar{x}$ = arithmetischer Mittelwert der Peakhöhen in mm, berechnet aus jeweils 8 Einzelwerten (= 1 DC-Platte)

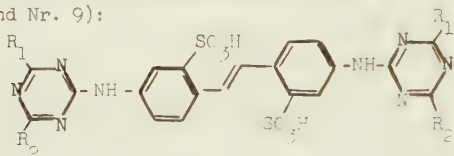
s_{rel} = relative Standardabweichung (%) der Peakhöhen, berechnet aus jeweils 8 Werten (= 1 DC-Platte).

Diese Ergebnisse zeigen, dass für die quantitative DC nicht alle 5 Fließmittel gleich brauchbar sind. Während Fließmittel III (= n-Butanol-Ammoniak) gute Reproduzierbarkeit der Peakhöhen innerhalb einer DC-Platte gewährleistet ($s_{rel} < 4 \%$), führt Fließmittel IX zu hohen Schwankungen ($s_{rel} = 7-35 \%$).

B. 9 verschiedene fluoreszierende Verbindungen, chromatographiert mit Fließmittel III

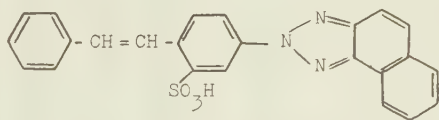
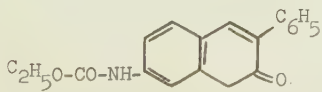
Weiter oben wurde gezeigt, dass Fließmittel III (= n-Butanol-Ammoniak) für quantitative DC am günstigsten erscheint. Um diese Feststellung zu erhärten, haben wir die Reproduzierbarkeit der Peakhöhen innerhalb einer Platte mit 8 Auftragungen mit weiteren fluoreszierenden Verbindungen geprüft.

Allgemeine chemische Struktur der geprüften Verbindungen (ausgenommen Nr. 1 und Nr. 9):



Tab. 24

Reproduzierbarkeit der Peak-Höhen

Verbindung Nr.	R ₁	R ₂	rel. Standard- abweichung (s _{rel})
1	-NH- 	-NH-(CH ₂) ₄ -OCH ₃	3,2 %
2	-NH- 	-N 	3,4
3	-NH- 	-NH-(CH ₂) ₂ OCH ₃	3,8
4	-NH- 	-NH- 	2,3
5	-NH- 	-O-CH ₂ CH ₂ -OH	3,3
6	-NH- 	-N 	10,1
7			2,7
8	-NH- 	-N 	4,0
9			2,6

Verbindungen Nr. 5 und 6 ist die Reproduzierbarkeit befriedigend (s_{rel} < 5 %).

Beispiel: Fluoreszierende Verbindung Nr. 4

Fig. 18

Foto der DC-Platte



Fig 19

Dazugehöriges Densitogramm

Bahn 1	98,0 mm Peakhöhe
2	97,5 mm
3	96,0 mm
4	94,5 mm
5	93,0 mm
6	93,0 mm
7	95,5 mm
8	92,0 mm
$\bar{x}$	95,0
s_{rel}	2,3 %



4.5 LITERATUR

- [1] H. GAENSHIRT in E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, Springer Verlag, 1967, 2. Auflage, S.134
- [2] C.A. JOHNSON in E.J. Shellard, *Quantitative Paper and Thin-layer Chromatography*, Academic Press, London and New York, 1968, S.101
- [3] D. Waldi in E. Merck AG., *Chromatographie*, Darmstadt 1967, S.67
- [4] K. LINGNER Fa. CIBA-GEIGY AG., Basel, Private Mitteilung
- [5] H. SEILER Helv., 46.2629 (1964)
- [6] G. KORTUM, J.VOGEL Angew. Chem., 71.451 (1959)
- [7] H. JORK Z. Anal. Chem., 221.17 (1966)
- [8] P. KUBELKA, F. MUNK Z. Techn. Phys., 12.593 (1931)
- [9] E.J. SHELLARD Quantitative Paper- and Thinlayer Chromatography Academic Press, London and New York, 1968, S.64
- [10] H. JORK Z. Anal. Chem., 236, 310 (1968).

